UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 - Thèse n° 588

# Utilisation "In Vitro" des indicateurs nucléaires

# Quelques applications à la Biologie Clinique

Thèse pour le Doctorat de l'Université

Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le Samedi 13 Décembre 1969

par Roselyne SERCEAU

née le 20 Août 1940 à VILLENAVE-d'ORNON (Gironde)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM P. BLANQUET, Professeur . . . . . Président

J. MASQUELIER, Professeur . . . . . }

J. RIVIÈRE, Professeur . . . . . } Juges

P. FERRET-BOUIN, Professeur . . . . . }

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 - Thèse n° 588

# Utilisation "In Vitro" des indicateurs nucléaires

# Quelques applications à la Biologie Clinique

Thèse pour le Doctorat de l'Université
Mention Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
le Samedi 13 Décembre 1969

par Roselyne SERCEAU
née le 20 Août 1940 à VILLENAVE-d'ORNON (Gironde)

## EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM P. BLANQUET, Professeur . . . . . Président
J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Juges
J. RIVIÈRE, Professeur . . . . . Juges
P. FERRET-BOUIN, Professeur . . . . . Juges

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# A V A N T - P R O P O S

-:-:-:-

L'apparition de procédés analytiques basés sur l'utilisation de radioisotopes est déjà relativement ancienne puisque les premiers travaux de KESTON concernant l'analyse dérivée datent de 1949.

A l'époque, ils n'ont soulevé qu'un intérêt assez restreint mais, plus récemment, l'étude d' "agents liants spécifiques" a provoqué un véritable essor de ces techniques et leur généralisation rapide.

Etant donné les nombreuses possibilités d'application dans le domaine de la Biologie clinique et, particulièrement de l'Endocrinologie, et en raison des perspectives nouvelles qui s'ouvraient pour le dosage de certaines hormones, Monsieur le Professeur BLANQUET nous a honorée de sa confiance en nous demandant d'effectuer ce travail, pensant qu'il pourrait être d'un grand intérêt pour la plupart des Biologistes et des Cliniciens.

Durant toutes nos études de Pharmacie, Monsieur le Professeur BLANQUET n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés. Son Laboratoire nous a toujours été ouvert avec une bienveillance que nous ne saurions oublier. Il nous a été ainsi permis de découvrir ce qu'est un"Maître". Il nous fait, aujourd'hui, le grand honneur de présider notre Jury de Thèse, nous le prions d'accepter l'expression de nos sentiments de très grande gratitude et de notre déférente admiration.

Guidée par M. Dominique DUCASSOU, nos premiers pas en Biologie se sont traduits par une "fonction d'interne" dans le Service de Biochimie de l'Hôpital PELLEGRIN-TONDU. C'est lui qui, à nouveau, par ses connaissances, son expérience et ses inlassables encouragements, a permis la réalisation de ce travail. Qu'il trouve, ici, l'expression de notre très amicale reconnaissance

*

* *

Monsieur le Professeur MASQUILLIER, Président de l'U.E.R. de PHARMACIE, n'a pas hésité, malgré ses importantes obligations à venir nous faire part de ses remarques. Nous sommes particulièrement heureuse de pouvoir le remercier de l'honneur qu'il nous fait, car il prouve, ainsi, tout l'intérêt qu'il attache aux problèmes de la Médecine Nucléaire et, au-delà, à la collaboration médico-pharmaceutique. Qu'il nous permette, enfin, d'évoquer le temps encore proche de son enseignement lumineux qui nous a particulièrement marquée.

Monsieur le Professeur RIVIERE qui a toujours manifesté beaucoup d'intérêt pour les méthodes nouvelles et, en particulier, pour le dosage des hormones réputées difficiles à doser (testostérone, cortisol, aldostérone...) a bien voulu siéger dans notre Jury. Sa présence est une marque de grande amitié qui ne se dément point, amitié qui, à travers nous, s'en va vers nos parents. Qu'il nous permette de l'en remercier doublement et très respectueusement.

Nous pensons pouvoir dire que c'est sous le signe de la sympathie que Monsieur le Professeur FERRET-BOUIN a accepté de nous juger. Qu'il veuille bien accepter nos remerciements pour celà et pour les conseils qu'il a bien voulu nous donner dans le passé et au cours de nos études.

*

* *

Que tous nos Maîtres,

Que Monsieur FAUGERE, notre Directeur au Laboratoire Municipal, qui a bien voulu nous donner toutes facilités pour mener à bien notre étude,

trouvent ici l'expression de nos sentiments très reconnaissants.

* * *

Que tous les Collaborateurs de l'Unité 53, qui ont apporté une contribution discrète, mais si efficace et si amicale à l'élaboration de ce travail, acceptent, avec nos remerciements, l'expression de notre bien vive reconnaissance.

*
*  *

Enfin, il nous tient à coeur de rendre un hommage respectueux

à Monsieur le Doyen MEYNIEL qui est à l'origine de notre carrière,

à Monsieur le Professeur BONFILS qui, nous ayant associée à ses travaux à BICHAT, a su nous donner le goût de la Recherche.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

# S O M M A I R E


Première Partie

I - ANALYSE DERIVEE

A) Technique utilisant un entraîneur.

B) Technique utilisant un indicateur :

1° - L'indicateur est ajouté après la formation du dérivé ;

2° - L'indicateur est ajouté avant la formation du dérivé.

C) Applications :

- Dosage des hormones stéroïdes.

°

° °

Deuxième Partie

II - METHODES BASEES SUR L'EMPLOI D'UN "AGENT LIANT" SPECIFIQUE

A) Caractères communs :

1° - Exigences concernant les réactifs :

a) composé marqué

b) réactif spécifique

2° - Méthodes de séparation des fractions libre et liée.

B) Différentes méthodes et leurs applications.

1° - Dosage par fixation compétitive sur une protéine :

a) Analyse par saturation :

Applications :

- Dosage de la thyroxine
- Dosage de la vitamine $B_{12}$

b) Analyse par déplacement :

Applications :

- Dosage des hormones stéroïdes
- Dosage de la thyroxine

2° - Dosage radioimmunologique :

a) Principe

b) Production et sélection des anti-corps

c) Applications :

- Dosage de l'insuline
- Dosage de quelques hormones ante-hypophysaires
- Dosage de la triiodothyronine

3° - Dosage radioenzymatique

Application :

- Dosage de l'acide folique

==========

# I N T R O D U C T I O N

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Jusqu'à ces dernières années, les méthodes physiques, chimiques, et même microbiologiques, offraient au biochimiste de nombreuses possibilités analytiques. Malgré cette multiplicité, l'analyste se trouvait souvent contraint de recourir à des méthodes complexes, longues et insuffisamment sensibles ; parfois même, les problèmes posés demeuraient insolubles.

L'introduction des radioisotopes dans la biochimie classique, a permis une simplification des techniques toujours complexes et la résolution de problèmes inabordables par les procédés de l'analyse classique. En apportant souplesse et rapidité dans la mesure des processus physiologiques, ils sont devenus un auxiliaire précieux de l'investigation clinique. Enfin, leur possible absorption par les organismes vivants a permis le contrôle de métabolismes complexes.

Cette absorption n'est cependant pas sans inconvénient possibles pour l'organisme receveur, et leur administration à l'Homme n'est jamais souhaitable, elle est même dans certains cas, formellement interdite (I* chez l'enfant ou la femme enceinte, par exemple). Ces interdictions sont un inconvénient grave qui limite sous cette

forme, l'utilisation des éléments radioactifs.

Pour remédier à cet inconvénient, les recherches s'orientent de plus en plus vers leur utilisation "in vitro", où ils se comportent comme des réactifs d'un type inusité. Au cours de cet exposé, nous verrons comment certains dosages hormonaux, lourds et pénibles par les méthodes d'analyse classique, se transforment en de simples déterminations analytiques impliquant une banale mesure de radioactivité.

Si le principe d'incorporation "in vitro" d'un élément radioactif dans une molécule complexe pour en suivre ultérieurement le comportement est déjà ancien, des travaux se poursuivent pour en étendre l'application à des molécules nouvelles. Nous rapporterons, ici, quelques exemples des efforts entrepris pour rendre rapide et simple une identification et un dosage laborieux.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes attachée particulièrement à montrer l'importance des techniques analytiques dérivées de ce principe et leur application à la Radioimmunologie.

Disons encore que les procédés de l'analyse par les radioisotopes "in vitro" offrent à l'analyse biologique appliquée à la clinique, des avantages précieux. Ils sont en effet, sans danger pour le patient ; ils peuvent donc être répétés aussi souvent que cela est nécessaire, enfin ils n'impliquent pas la présence permanente du malade.

o

o o

# PREMIERE PARTIE

## A N A L Y S E  D E R I V E E

Le principe de cette méthode générale, développée par KESTON (76) (81), est la transformation d'un composé à doser non marqué A inclus dans un mélange, en un dérivé radioactif par action d'un réactif marqué par un radio-isotope R*.

La réaction peut être schématisée ainsi :

$$A + R^* \rightleftharpoons AR^*$$

Ce type de réaction a permis la mise au point des méthodes d'analyse suivantes :

1° - Technique utilisant un entraîneur.

2° - Technique utilisant un indicateur.

Ces deux techniques procèdent du même principe ana-

lytique qui comporte :

- la formation du dérivé AR* ;

- l'isolement d'une fraction ou de la totalité du dérivé, par chromatographie ou par action d'un solvant ;

- sa purification, qui conditionnera la précision du résultat ;

- le dosage proprement dit, qui consiste à mesurer l'activité du dérivé par rapport à celle d'un indicateur ajouté en quantités connues dans le milieu réactionnel.

Avant d'envisager ces différentes techniques et leur application, et pour permettre une plus grande compréhension du texte, nous utiliserons les symboles suivants tout au long de notre étude :

| | | |
|---|---|---|
| A | : | composé à doser |
| R* | : | réactif marqué |
| AR* | : | dérivé marqué du composé à doser |
| AR | : | entraîneur |
| A*, AR'* | : | indicateur |

o

o o

## A - TECHNIQUES UTILISANT UN ENTRAINEUR (81)

Dans ce procédé, la formation de AR* est totale :

$$A + R^* \longrightarrow AR^*$$

AR* se trouvant généralement en faible quantité, sa purification est difficile.

Pour remédier à cet inconvénient, on utilise un entraîneur AR (c'est-à-dire le dérivé non marqué de A), qui est ajouté en quantités très importantes par rapport à AR*.

L'entraîneur et la fraction radioactive sont alors isolés du milieu réactionnel et soumis à une purification, jusqu'à l'obtention d'une radioactivité spécifique constante. Cette purification pose souvent des problèmes. KESTON et coll. (81) travaillant sur les dérivés pipsyl d'acides aminés, pensaient mener à bien la purification en utilisant les différences de solubilité entre AR, AR* et les impuretés. Après un très grand nombre d'extractions suivies de cristallisations, ces auteurs n'obtenaient que de très petits changements dans la concentration isotopique de l'entraîneur : la cristallisation seule ne suffisait donc pas. De plus, les acides aminés pipsyl, comme tous les acides aminés, ont une forte tendance à la coprécipitation. Ce phénomène entraîne une distribution des impuretés entre l'entraîneur précipité et en solution, identique à celle observée entre deux solvants non miscibles.

Cette distribution est définie par une constante $K_D$ :

$$K_D = \frac{\dfrac{\text{quantité d'impuretés}}{\text{quantité d'entraîneur}}}{\dfrac{\text{quantité d'impuretés}}{\text{quantité d'entraîneur}}} \quad \begin{matrix} \text{Solution} \\ \\ \text{Précipité} \end{matrix}$$

Cette constante $K_D$ n'est donc pas fonction de la quantité absolue d'impuretés.

Les différents acides aminés pipsyl ayant des coefficients de distribution caractéristiques pour un entraîneur donné, le degré de purification, dans une cristallisation, dépendra de la valeur de $K_D$ et de la quantité d'entraîneur que l'on accepte de sacrifier.

En effet :

- si $K_D$ est grand, le degré de purification est faible ;
- si $K_D$ est petit, la cristallisation seule est une méthode de purification vaine ;
- si on perd seulement de petites quantités d'entraîneur, la variation de la concentration isotopique est tellement lente qu'on peut penser avoir atteint l'activité spécifique constante, alors qu'il reste une quantité appréciable d'impuretés dans le produit à doser.

Cette purification peut donc entraîner la perte d'une grande fraction d'entraîneur, mais elle est sans incidence sur le résultat : le dosage proprement dit consiste essentiellement à déterminer le rapport :

radioactivité de AR* / quantité d'entraîneur purifié

On obtient par cette méthode, la valeur de A en appliquant la formule :

$$A = N \frac{Cc}{Cr}$$

où :

N - est le nombre de môles d'entraîneur ajouté au milieu réactionnel ;

Cc - la concentration isotopique molaire de l'entraîneur purifié à doser ;

Cr - la concentration isotopique molaire d'un étalon AR* pur.

Cette technique est surtout utilisée dans l'analyse de composés actifs sur la lumière polarisée : un entraîneur racémique, ajouté en excès dans le milieu réactionnel, assure le dosage des deux formes actives. Pour le dosage de chaque isomère, l'entraîneur, en excès, est constitué par la même forme, lévogyre ou dextrogyre, de l'isotope engagé dans la combinaison AR*.

Cette méthode est particulièrement employée pour l'analyse d'acides aminés dont le degré de racémisation entraîné par l'hydrolyse est inconnu, et encore, pour doser une des formes actives en présence de l'autre :

tel est le cas du dosage de la D-alanine en présence de grandes quantités de l'amino acide L (80).

o

o o

## B - TECHNIQUES UTILISANT UN INDICATEUR

Dans ces techniques, l'indicateur est ajouté soit après, soit avant la formation de AR* :

1 - Si l'indicateur est ajouté après la formation de AR*, cette première étape de l'analyse doit être quantitative.

2 - Si l'indicateur est ajouté avant la formation de AR*, aucune des réactions n'exige d'être quantitative.

Dans les deux procédés, l'indicateur étant ajouté en quantité connue, il permet de déterminer le coefficient de perte : son pourcentage de récupération est valable pour le composé AR*.

Envisageons maintenant ces deux modalités et leur application.

1°) L'indicateur est ajouté après la formation de AR*

La réaction $A + R^* \longrightarrow AR^*$ doit donc être totale.

L'indicateur peut être non radioactif, mais le plus souvent marqué par un isotope différent de celui qui sert au marquage de AR*. Il est donc représenté par le dérivé AR'* qui est ajouté au milieu réactionnel avant d'isoler AR*.

Après récupération et purification d'une fraction quelconque, on déterminera la radioactivité liée à AR* et celle liée à AR'* sans chercher à séparer les deux dérivés puisqu'ils sont marqués différemment.

KESTON, UDENFRIEND et LEVY (82) (83) ont appliqué cette méthode au dosage des acides aminés :

R* est constitué par du chlorure de pipsyl - $^{131}I$

AR'* est constitué par les dérivés pipsyl - $^{35}S$

Les radiations caractéristiques de $^{131}I$ et $^{35}S$ étant différentes, il est possible de déterminer leur proportion respective au sein de la fraction isolée et de calculer la quantité du composé à doser :

$$A = \frac{X \times T}{Y \times Cr}$$

où : X est la radioactivité de $^{131}I$ dans la fraction isolée
Y est la radioactivité de $^{35}S$ " " " "
T est la radioactivité initiale de AR'*
Cr est l'activité molaire de R*

2°) L'indicateur est ajouté avant la formation de AR*

Dans cette méthode, l'indicateur est la substance A marquée par un isotope différent de celui de AR*, soit A*.

La réaction peut être schématisée ainsi :

$$A + A^* + R^* \rightleftharpoons AR^* + A^*R^*$$

Une fraction du mélange est purifiée et le rapport isotopique $\frac{A^*}{R^*}$ est déterminé.

La valeur de A est déduite de la comparaison entre le rapport isotopique de l'échantillon à doser et celui d'un étalon obtenu dans les mêmes conditions.

Cette méthode permettra aussi le dosage de substances ne formant pas directement AR* avec le réactif isotopique.

KESTON et coll. (99) prennent, par exemple, une solution d'acide chloracétique où ils ajoutent l'indicateur : l'acide chloracétique - $^{14}C$ puis de l'ammoniac. Ils obtiennent ainsi les réactions suivantes :

Ac. chloracétique + $NH_3$ ——— Glycine (A)

Ac. chloracétique - $^{14}C$ + $NH_3$ ——— Glycine-$^{14}C$(A*)

Cette réaction préliminaire avec l'ammoniac a permis de former un composé qui pourra réagir avec R* comme nous l'avons vu précédemment.

FOSS (51) utilise le même procédé pour doser l'oxalate dans l'urine : l'oxalate, converti en acide oxalique par un acide fort, est extrait et précipité par du $^{45}Ca$. L'indicateur est l'oxalate - $^{14}C$.

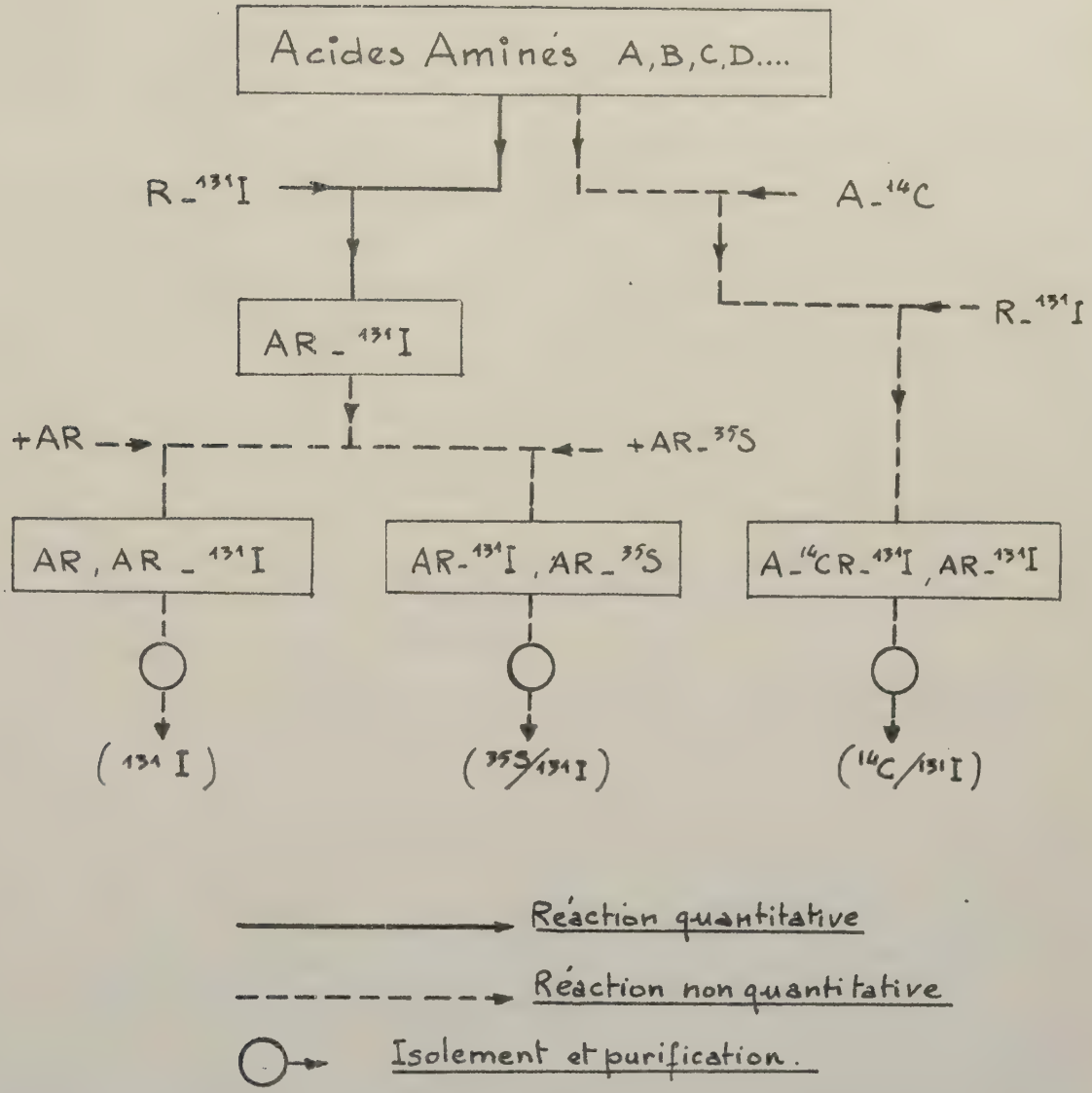
KESTON (77) (78) analyse par cette même méthode des mélanges d'acides aminés et des hydrolysats de protéines.

Un hydrolysat de protéines (H*) est obtenu à partir d'une culture de Thiobacillus Thioparus en présence de $^{14}CO_2$ comme seule source de carbone. L'auteur se propose alors, de déterminer la quantité de glycine - $^{14}C$ contenue dans cet hydrolysat.

Une partie de H* est, à cet effet, diluée avec une quantité déterminée de glycine : on obtient un hydrolysat dilué (H'*). H* et H'* réagissent séparément avec du $Cl^-$ de pipsyl - $^{131}I$. La quantité de glycine - $^{14}C$ contenue dans H* est évaluée par comparaison des rapports isotopiques $\frac{^{14}C}{^{131}I}$ des dérivés isolés des milieux réactionnels.

Connaissant l'activité du $^{14}CO_2$ utilisé, et ayant déterminé la glycine, KESTON calcule l'activité molaire des autres acides aminés élaborés par ce microorganisme. Tous les carbones ayant une même activité molaire : la leucine par exemple, aura une activité molaire triple de celle de la glycine. Ainsi cet hydrolysat pourra servir d'indicateur (78).

L'ensemble des possibilités fournies par ces techniques est schématisé par le Tableau suivant :


Acides Aminés A,B,C,D....
R-131I
A-14C
AR-131I
R-131I
+AR
+AR-35S
AR, AR-131I
AR-131I, AR-35S
A-14CR-131I, AR-131I
(131I)
(35S/131I)
(14C/131I)
Réaction quantitative
Réaction non quantitative
Isolement et purification.

## C - APPLICATION DE L'ANALYSE DERIVEE

Les techniques que nous venons de définir ont des applications nombreuses en Biologie.

Elles sont employées particulièrement pour l'analyse :

- des acides aminés (77)(78)(80)(81)(82)(83)
- des peptides (86)
- du dernier maillon de la chaîne des protéines (152)
- des purines et pyrimidines (53)
- de l'histamine (139)
- des hormones stéroïdes (14)(120)(140)(149)(156)
- de l'oxalate (51)

Nous ne traiterons pas ici chacune de ces méthodes en particulier, mais à titre d'exemple, nous développerons l'analyse des hormones stéroïdes qui est d'un grand intérêt en Biologie clinique.

Malgré leur très faible concentration sanguine, le dosage de ces hormones, et en particulier celui de l'aldostérone (1 n g/20 ml de plasma) est maintenant possible par la méthode de dilution isotopique. L'aldostérone est, en effet, susceptible d'un marquage par le $^{14}C$ ou par le $^{3}H$, et les produits ainsi obtenus possèdent une activité spécifique suffisante pour être utilisés comme indicateurs

de récupération interne.

Selon l'indicateur et le réactif utilisés, deux groupes de méthodes (140) se sont développés :

Premier Groupe :

- Indicateur : aldostérone - $^{3}H$
- Réactifs : anhydride sulfonique p-iodobenzène-$^{35}S$ (ou pipsan)
  anhydride sulfonique p-toluène-$^{35}S$ (ou tosan)
  anhydride acétique-$^{14}C$

Deuxième Groupe :

- Indicateur : aldostérone - $^{14}C$
- Réactif : anhydride acétique - $^{3}H$

La fidélité et l'exactitude de ces deux méthodes ont été testées par le dosage d'étalons d'aldostérone.

Les réactifs, comme l'anhydride acétique-$^{14}C$ (117) et le $^{35}S$-pipsan (15), se sont révélés d'un emploi peu pratique. En effet, le premier offre une faible radioactivité spécifique et un prix de revient élevé ; le second est un réactif instable et donne des témoins élevés.

Le procédé utilisant le $^{35}S$-tosan a été développé par BOJESEN (17). S'il présente certains avantages : haute activité spécifique, estérification quantitative rapide, destruction rapide de l'excès après la réaction, il a des

inconvénients certains (140) :

- la nécessité de préparer le $^{35}S$-tosan par condensation avec l'acide tosyl-$^{35}S$ au laboratoire,

- sa conservation : l'irradiation du $^{35}S$-tosan pendant le stockage, entraîne une augmentation du témoin,

- l'instabilité du tosylate d'aldostérone en présence d'une haute activité de $^{35}S$.

Pour ces différentes raisons, la technique préconisée par BOJESEN (16) est restée du domaine expérimental, et c'est celle préconisée par SCOGGINS (32) qui est utilisée pour les dosages de routine. Cette dernière emploie comme indicateur, l'aldostérone marquée au $^{14}C$, et, comme réactif, l'anhydride acétique marquée au $^{3}H$. Il convient de procéder à la distillation extemporanée du réactif et d'ajouter un large excès d'indicateur.

L'emploi d'anhydride acétique-$^{3}H$ comme réactif dérivant, a permis le dosage de plusieurs hormones stéroïdes contenues dans un même échantillon (33)(140). Dans ces méthodes la séparation des hormones n'est pas faite avant l'acétylation. Ainsi, dans la technique de SCOGGINS, les hormones, extraites par le dichlorométhane, sont traitées par une solution à 10 %"d'anhydride acétique-$^{3}H$ dans du benzène anhydre pendant 18 h. à 37° pour former un diacétate d'aldostérone (BRODIE et coll. (18) favorisent la formation d'un monoacétate). Une première chromatographie sur papier sépare les hormones estérifiées. De ce chromatogramme sont succes-

sivement extraits :

- la testostérone et la déhydro-épiandrostérone lors d'une première élution ; la testostérone est ensuite extraite par le procédé d'HUDSON (70) ;

- la désoxycorticostérone, éluée à son tour, est purifiée par une nouvelle chromatographie ;

- l'aldostérone, la corticostérone et le désoxycortisol sont enfin élués ensemble ; une chromatographie permet d'isoler l'aldostérone. Les deux autres composés élués à leur tour sont eux aussi séparés par chromatographie.

Nous mentionnerons encore le dosage :

- de la testostérone et des 17 cétostéroïdes suivant la méthode de GANDY et PETERSON (55), où les hormones isolées par chromatographie, sont ensuite estérifiées par l'anhydride acétique marqué.

- de la progestérone, réduite préalablement par action enzymatique, puis hydroxylée, enfin séparée par chromato - graphie des dérivés hydroxylés en 20 $\alpha$ et 20 $\beta$ .

o

o o

## CONCLUSION

Le bref exposé des méthodes isotopiques utilisant le principe de "l'analyse dérivée" et l'exemple que nous avons décrit soulignent l'extrême sensibilité de ces méthodes qui permettent le dosage de substances biologiques existant à l'état de traces dans les échantillons traités.

Le schéma que nous avons donné du dosage des hormones stéroïdes, fait ressortir les énormes difficultés inhérentes à la séparation et à la purification nécessaire de chaque molécule préalablement ou ultérieurement combinée au réactif marqué.

# DEUXIEME PARTIE

## METHODES BASEES SUR L'EMPLOI D'UN "AGENT LIANT" SPECIFIQUE

En 1960, deux techniques de dosage ont été mises au point, indépendamment, dans deux laboratoires :

- d'une part, le dosage de la thyroxine par EKINS (38), qui utilise une protéine porteuse, existant à l'état naturel, comme réactif spécifique ;
- d'autre part, le dosage de l'insuline par YALOW et BERSON (159), où le réactif spécifique est un anticorps.

Ces deux travaux sont à l'origine de différentes méthodes qui ont comme caractéristique commune : l'emploi d'une substance, existant à l'état naturel, pouvant fixer ou réagir spécifiquement avec le composé à doser.

Ces méthodes sont l'application d'un même principe fondamental (40) : si un composé à doser S réagit avec un réactif spécifique R (introduit en quantités détermi-

nées), seule, une fraction de S réagit avec R selon le schéma suivant :

(I) $$S + R \rightleftharpoons RS_1 + S_2$$

où : $RS_1$ - représente la fraction de S qui a réagi, c'est-à-dire qui est liée ;

$S_2$ - représente la fraction de S qui n'a pas réagi, c'est-à-dire qui est restée libre.

Si, dans ce système, nous ajoutons en quantités définies un traceur, c'est-à-dire la substance S marquée par un isotope, la réaction R + S* sera fonction de la quantité de S présente dans le milieu réactionnel, et nous pouvons écrire :

(II) $$S + R + S^* \rightleftharpoons RS_1 + RS_1^* + S_2 + S_2^*$$

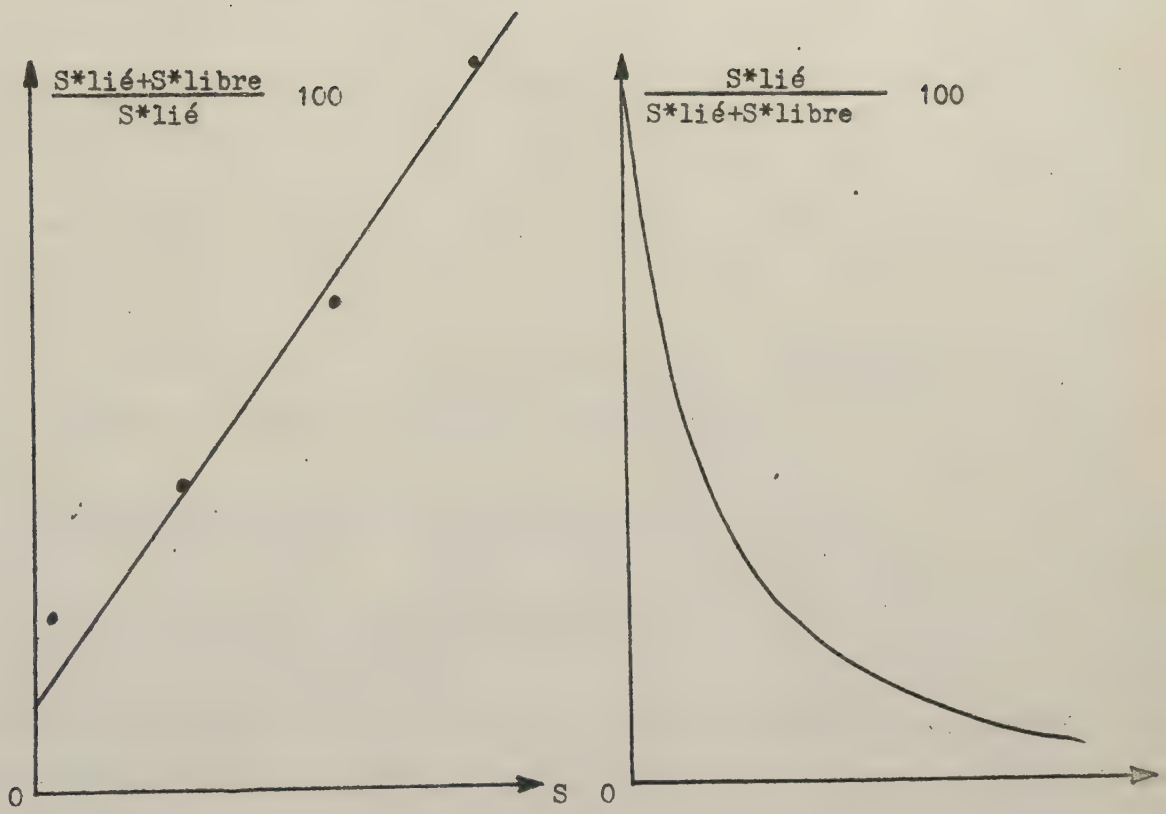
où, de la même façon :

$RS_1^*$ - représente la fraction de S* qui a réagi,

$S_2^*$ - représente la fraction de S* qui n'a pas réagi.

Nous pouvons déterminer, pour des doses croissantes de S, les valeurs respectives de $RS_1^*$ et $S_2^*$ en séparant la fraction liée $RS_1^*$ de la fraction libre $S_2^*$.

Si on note en abscisses la quantité de S non radioactif et en ordonnées le pourcentage de S* lié au réactif par rapport à S* total, on obtient une courbe d'étalonnage hyperbolique qui s'approche de zéro pour les valeurs élevées de S (63) (cf Courbe n° 1).




Courbe n° 2 — Courbe n° 1

Comme nous le voyons sur la courbe n° 2 ci-dessus, il est possible de porter en ordonnées l'inverse du pourcentage de S* lié au réactif (101) ce qui donne, en théorie, une ligne droite ; en réalité, la ligne n'est droite que dans sa partie moyenne et s'incurve à ses extrêmités.

RODBARD et coll. (121) proposent, lors d'une étude critique de ces modes d'expression, de noter en abscisses le log de S , en ordonnées, le logit de la fraction $\frac{S^* \text{ liée}}{S^* \text{ total}}$.

Ils obtiennent ainsi une ligne droite.

Quelle que soit la représentation de la courbe, le composé à doser, traité dans les mêmes conditions, donnera une valeur X de $RS_1^*$. Le report de cette valeur sur la courbe d'étalonnage permet d'évaluer directement la quantité de composé présent dans l'échantillon.

La spécificité du dosage repose donc essentiellement sur la spécificité de réaction entre R et S.

Si nous reprenons l'équation (II) :

$$S + R + S^* \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} RS + RS^* + S + S^*$$

et, si nous appliquons la loi d'action de masse, nous avons une constante d'équilibre :

$$K = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[RS + RS^*]\ [S + S^*]}{[S + R + S^*]}$$

La sensibilité du dosage dépendra donc de cette constante K et, par conséquent, de $K_1$ et $K_2$ :

En effet, si $K_1 > K_2$ , la formation de RS sera plus facile et plus rapide ; le dosage sera donc plus sensible. (Si $K_2 \longrightarrow 0$ la réaction tend à devenir irréversible).

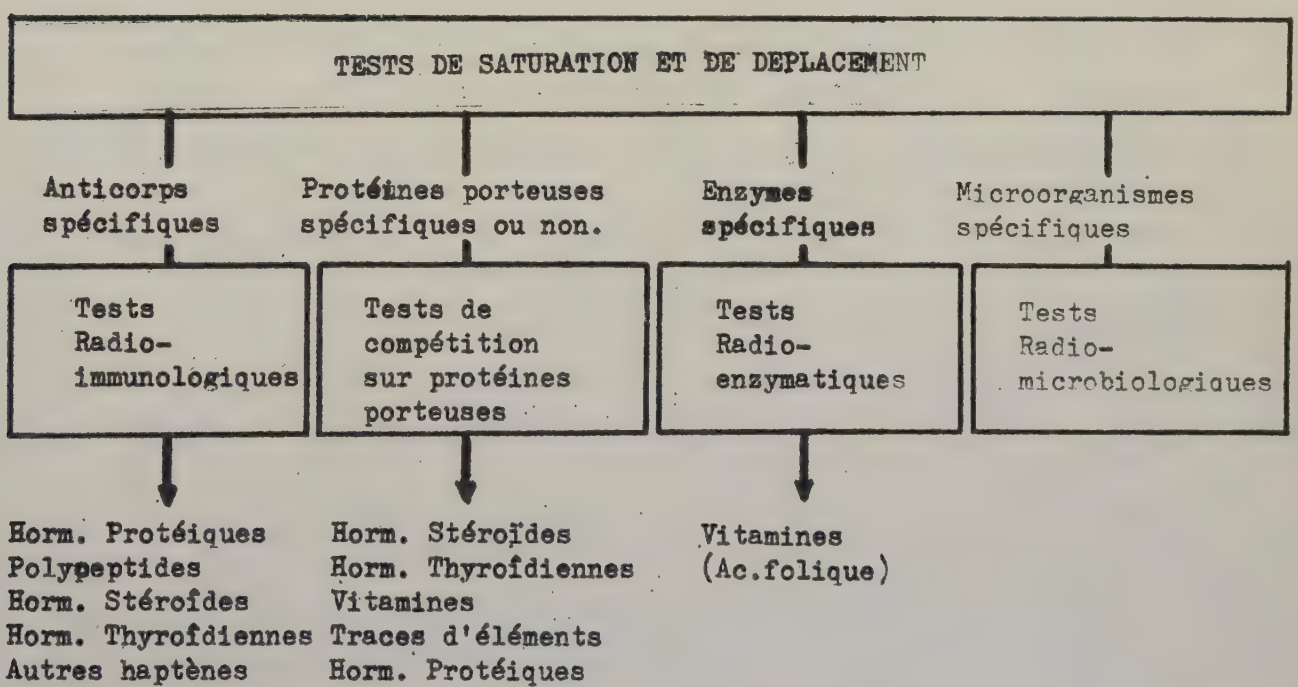
De ces considérations générales, il résulte que :

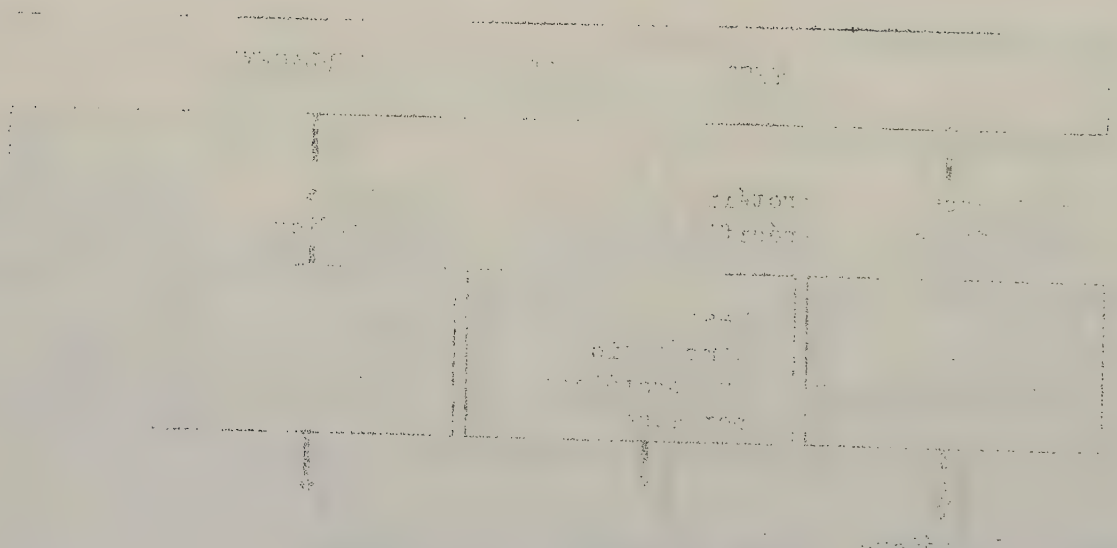
- le composé S doit avoir une certaine affin
  pour R (cette affinité définit quantitativ
  ment la fraction RS ) ;

- les concentrations respectives de R et S*
  doivent être proportionnées avec celle de S

- l'activité spécifique du traceur doit être s
  fisante pour permettre le dosage des fractio
  séparées.

S'il est possible de rassembler, sous forme de table
les différents domaines d'application de cette méthode e
fonction du réactif utilisé, il est difficile d'applique
un qualificatif au principe général (cf Tableau suivant,
d'après EKINS (40)).





Le terme "d'analyse par saturation" semble pour EKINS être la désignation la plus logique, mais la loi d'action de masse implique que R n'est pas pleinement saturé. Tous les sites réactifs possibles ne sont pas occupés si la réaction entre R et S demeure réversible. En outre, si R et S sont à des concentrations très faibles, une grande proportion des sites réactionnels sont inoccupés.

MURPHY (101) (109) propose "analyse par fixation compétitive sur les protéines", mais cette dénomination suppose un champ d'application restreint que ne prévoit pas le principe général de la méthode.

"Analyse par déplacement" (40), ne convient pas non plus : l'échange ne peut être réalisé si S et $S^*$ sont mis en présence avant le réactif.

YALOW et BERSON (162) ont voulu étendre le dosage radioimmunologique de l'insuline (5)(6)(7)(12)(158), qui repose sur le même principe à des systèmes non immuns et l'appellent "Radio-dosage compétitif", mais le principe est applicable à tous les traceurs et pas seulement aux radioisotopes.

Quoiqu'il en soit de sa dénomination, le principe général de cette méthode d'analyse est représenté par les étapes successives suivantes :

- Réaction du composé à doser S , du traceur $S^*$ et du réactif R.
- Séparation des fractions, libre et liée.

- Mesure de la radioactivité des fractions séparées.

Toutes les méthodes qui en dérivent, présentent des caractères communs :

1°) Les exigences concernant les réactifs :

a - composé marqué

b - réactif spécifique

2°) Les méthodes de séparation des fractions contenant les composés S , $S^*$ et RS , $RS^*$.

mais elles se différencient par la nature du réactif utilisé et la modalité de réaction entre le composé à doser et le réactif.

Nous nous proposons d'étudier ces caractères communs avant d'examiner les particularités propres à chacune de ces méthodes qui seront classées en fonction du réactif employé.

Nous distinguerons ainsi :

1° - Les méthodes utilisant une protéine sérique ou tissulaire spécifique, ou un autre fixateur biologique : Dosage par fixation compétitive sur une protéine.

2° - Les méthodes utilisant un anticorps spécifique : Dosage radioimmunologique.

3° - Les méthodes utilisant un enzyme spécifique : Dosage radioenzymatique.

## A - CARACTERES COMMUNS

### 1° - EXIGENCES CONCERNANT LES REACTIFS

#### a) Composé marqué (traceur)

Le traceur, qui sert à suivre l'extraction de S du milieu biologique et à déterminer la proportion des fractions libre et liée, doit répondre à certaines exigences (40) :

- être radiochimiquement pur -
- chimiquement identique à S -

Il ne doit donc pas contenir d'impuretés qui pourraient entrer en compétition avec S dans la réaction avec R : ainsi, des hormones stéroïdes marquées au Tritium par hydrogénation, sont radiochimiquement pures, mais elles peuvent contenir d'autres stéroïdes non marqués qui ont pris naissance lors de l'hydrogénation et qui constituent une impureté.

Notons, cependant, que dans le cas de l'analyse par déplacement, de l'analyse par saturation, où le traceur est ajouté après la réaction R + S , les exigences sont moins rigoureuses. Généralement, il suffit que $S^*$ entre en compétition avec S dans la saturation des sites de réaction de R, mais la présence d'impuretés peut diminuer la sensibilité et la précision du dosage et, finalement, fausser ce dernier si les impuretés ont un comportement

trop différent dans le milieu réactionnel de l'étalon et dans la solution à doser.

Cependant, lorsque la molécule à doser a une affinité pour le réactif R , supérieure à celle du traceur, le critère de pureté est moins important. Il est même possible, à la limite, d'utiliser un traceur radioactif différent de S. Cette possibil té est mise à profit dans le dosage des stéroïdes (63)(42), sans que soit diminuée la sensibilité de la réaction qui sert à leur dosage.

Enfin, le réactif $S^*$ doit avoir une radioactivité spécifique suffisante pour permettre un comptage valable des différentes fractions isolées par les méthodes classiques de l'analyse chimique. Mentionnons à titre indicatif que EKINS (40) effectue le dosage de la vitamine $B_{12}$ à un taux moyen de 0,15 pg/ml en utilisant une vitamine $B_{12}$ marquée au $^{57}Co$ dont l'activité spécifique est inférieure à 200 $\mu$ Ci/ $\mu$ g.

Dans le cas de la radioimmunologie (162), le réactif $S^*$ est obtenu par iodation de l'hormone à doser. L'activité spécifique du réactif est fonction du nombre d'atomes d'iode radioactif fixés. Ce nombre dépend à la fois de l'aptitude de la molécule à retenir l'iode et de l'abondance des atomes $I^*$ dans le liquide d'iodination.

Le choix de l'isotope radioactif est aussi fonction de sa, plus ou moins, facile détection et YALOW et BERSON ont, pour cette raison, préféré $^{125}I$ à $^{131}I$ malgré sa pé-

riode plus longue.

Indiquons encore que les réactifs utilisés en radio-immunologie, doivent avoir une haute activité spécifique. Mais la fixation sur la molécule hormonale d'un élément radioactif entraîne toujours sa légère dénaturation, et cette dénaturation est accentuée par l'irradiation ultérieure de la molécule. En utilisant l'insuline (8), BERSON a donné un exemple typique de la diminution de l'immuno-réactivité, consécutive à l'irradiation de la molécule.

La fragilité des molécules hormonales aux rayonnements ionisants que nous venons de mentionner, a pour conséquence l'instabilité du réactif S* (161) dont la conservation ne dépasse pas quelques semaines. Après ce délai, une purification avant son utilisation devient nécessaire.

b) Réactif spécifique

Nous avons vu, au début de notre étude, que la spécificité du réactif est indispensable à la bonne réalisation du dosage.

Dans la pratique courante, cette condition n'est pas toujours respectée : le réactif spécifique R est généralement la protéine sérique véhiculant l'hormone sur laquelle les sites de fixation sont plus ou moins polyvalents et confèrent à R une spécificité relativement faible (40).

Ainsi,

- la transcortine ou C.B.G. (Cortisol - Binding - Globulin), réagira avec différents stéroïdes : corticostérone, progestérone, cortisol, ...

- la "testérone-binding-globulin" réagira non seulement avec la testostérone, mais aussi avec les stéroïdes présentant un groupement hydroxyl en 17 β .

- la "thyroxin-binding-globulin" ou T.B.G. qui réagit préférentiellement avec la thyroxine fixe également la triiodothyronine ; en considérant que l'affinité de la $T_3$ pour la T.B.G. est 3 fois plus faible que celle de la $T_4$ (36) et que le taux de $T_3$ est sensiblement le $1/50^e$ de celui de $T_4$, en utilisant comme réactif la T.B.G., on détermine pratiquement la teneur du sérum en $T_4$.

Généralement, ce manque de spécificité peut être résolu, surtout dans le cas des hormones stéroïdes, par une extraction et une purification du composé à doser avant le dosage. MURPHY (103) propose une extraction par solvant, mais, si le composé est à un taux très bas, une séparation par chromatographie est préférable (74)(146)(165). Cependant, cette extraction peut entraîner l'introduction d'impuretés nouvelles.

Notons enfin, que l'albumine, difficile à éliminer des réactifs spécifiques naturels, manifeste généralement une capacité de liaison avec S , négligeable devant celle de R et qu'il est donc rarement indispensable d'isoler et de purifier la protéine porteuse.

Dans le cas particulier de la vitamine $B_{12}$, le réactif spécifique utilisé peut être soit la protéine fixante présente dans le sérum (transcobalamine) (43)(52), soit le facteur intrinsèque isolé (72) qui, on le sait, réagit de façon spécifique avec cette vitamine.

## 2° - METHODES DE SEPARATION DES FRACTIONS LIBRE ET LIEE

La méthode utilisée doit séparer le mieux possible les deux fractions $RS^*$ et $S^*$ , une mauvaise séparation diminuant la sensibilité de la méthode. Elle doit aussi être rapide, afin d'éviter une modification de l'équilibre de la réaction $S^* + R \rightleftharpoons RS^*$

C'est pour ces deux motifs essentiels que les techniques utilisées sont sans cesse modifiées et simplifiées. Les différentes méthodes de séparation qui ont été proposées permettent :

- l'isolement de la fraction libre $S^*$. $S^*$ libre est isolé du milieu réactionnel par adsorption sur une phase solide (68)(103)(108)(122) : charbon, silice, talc, Terre de Fuller, résines échangeuses d'ions.

- l'isolement de la fraction liée $RS^*$. La précipitation des protéines par du sulfate d'ammonium, l'acide trichloracétique ou le sulfate de zinc (129) entraîne la fraction $RS^*$.

- la séparation des fractions $S^*$ et $RS^*$. Les méthodes classiques de l'analyse biologique sont ici mises à profit :

  . chromatographie (74)(97)(110)(165)
  . électrophorèse (68)
  . dialyse (106)

Les méthodes successivement utilisées pour le dosage de la thyroxine permettent de suivre l'évolution et la simplification des techniques de séparation :

- EKINS (38) utilise l'électrophorèse ;

- MURPHY, l'adsorption sur Sephadex (110), puis la fixation sur un échangeur d'ions (108) ;

- NAKAJIMA (112), KAPLAN (73) et KENNEDY (75) préconisent l'emploi d'une résine échangeuse d'ions inclue dans une éponge.

Pour faciliter cette phase du dosage, CATT et TREGEAR (26) proposent de fixer préalablement le réactif (protéine ou anticorps) sur la paroi du tube où s'effectuera la réaction $R + S$. Lorsque la réaction est terminée, l'élimination de la phase liquide entraîne celle de la phase libre de $S$.

Pour la séparation du complexe antigène-anticorps, nous avons d'autres possibilités :

- Précipitation du complexe par action d'un deuxième anticorps (49).

- Extraction, sous forme de sels, quand les coefficients de solubilité de l'hormone et de l'anticorps sont suffisamment différents (61).

- Liaison de l'anticorps à certains matériaux solides (copolymères de styrène ; Séphadex) : le complexe sédimente et la fraction libre reste dans le surnageant (23)(157).

Pour compléter et schématiser les différentes méthodes de séparation, nous reproduisons, sur la page suivante, le tableau de CATT et TREGEAR (27).

TABLEAU selon CATT et TREGEAR (27)

1. - Migration différentielle du traceur libre et du traceur lié :

Chromatoélectrophorèse (7)

Electrophorèse (50)(71)

Gel filtration (56)(65)

Chromatographie (85)(116)

2. - Isolement du traceur libre :

Echangeur d'ions (91)

Adsorption sur dextran-charbon (68)

Adsorption sur talc ou silice finement divisée (122)

Adsorption sur poudre de cellulose (166)

3. - Isolement du traceur lié :

Précipitation par double anticorps avec filtration (67)

Précipitation par double anticorps avec centrifugation (98)

Précipitation par formation de sels (61)

Fractionnement par solvant (115)

Précipitation par dioxane (151)

Protéolyse enzymatique (96)

Anticorps fixé sur une phase solide :

- couplé de façon covalentielle à un support polymérisé insoluble (23)(24)(157)
- adsorbé sur la face interne de tubes en plastique (25)
- adsorbé sur des particules de bentonite (21)
- fixé sur gel (59)
- antisérums polymérisés (37)

## B - DIFFERENTES METHODES ET LEURS APPLICATIONS

Avant d'étudier successivement chaque groupe de méthodes, rappelons l'équation (II) qui schématise le principe général :

$$S + R + S^* \rightleftharpoons RS_1 + R_1^* + S_2 + S_2^*$$

### 1° - DOSAGE PAR FIXATION COMPETITIVE SUR UNE PROTEINE

Comme nous l'avons déjà mentionné, la substance liante est de nature protéique :

- Protéines porteuses sériques :
  - . transcortine ou C.B.G. (cortisol-binding-globulin)
  - . testosterone-binding-globulin,
  - . thyroxine-binding-globulin ou T.B.G.
- Protéines fixantes extraites du suc gastrique : le facteur intrinsèque.

Ce type de méthode est appliqué au dosage :

- de la thyroxine,
- des hormones stéroïdes,
- de la vitamine $B_{12}$ .

Nous les répartirons en deux groupes, en tenant

compte du moment où le traceur est ajouté :

a) $S^*$ est ajouté en même temps ou après la réaction R + S : nous aurons une analyse par saturation.

b) $S^*$ réagit d'abord avec R : nous aurons une analyse par déplacement.

a) ANALYSE PAR SATURATION

Ce procédé a été particulièrement étudié par EKINS (38)(39)(40)(41)(42). Le traceur peut être ajouté avant ou après la réaction de S avec R . Dans le premier cas, il permet de suivre l'extraction de S du milieu biologique et d'évaluer sa répartition. Dans le deuxième cas, il ne sert qu'à déterminer cette proportion. Mais, dans les deux circonstances, la radioactivité de la fraction liée $RS^*$ sera d'autant plus faible que le composé à doser S est en quantité plus importante.

Voyons maintenant ses principales applications

1 - Thyroxine

Son dosage repose sur l'emploi de la T.B.G. (thyroxine-binding-globulin). Deux méthodes (89) ont été proposées : l'une par EKINS et l'autre par MURPHY.

$\alpha$ - Méthode d'EKINS (38)(45)

Des doses croissantes de $T_4$ et une dose constante de $T_4^*$ sont ajoutées à un sérum étalon ; la séparatio

des fractions, libre et liée, est réalisée par électrophorèse. La mesure de la radioactivité liée à la T.B.G. permet de calculer le pourcentage de $T_4^*$ fixée. La courbe d'étalonnage est obtenue en rapportant les pourcentages de $T_4^*$ fixée en fonction des doses étalons.

La $T_4$ de l'échantillon à doser est extraite par du butanol et traitée dans les mêmes conditions que la $T_4$ des étalons. En reportant le pourcentage de $T_4^*$ fixée, sur la courbe d'étalonnage, on en déduit la valeur de la thyroxine inconnue.

β - Méthode de MURPHY (101)(108)(109)(111)

L'électrophorèse est remplacée par une chromatographie sur Séphadex (Dextran polymer gel Sephadex G 25) ou par l'emploi d'une résine échangeuse d'ions (Rexyn 202; $Cl\text{-}SO_4$ ; Fisher Scientific Co Ltd ; cat. n° R 253).

2 - Vitamine $B_{12}$

Le taux de vitamine $B_{12}$ dans le sérum, varie de 150 à 800 pg/ml. Il n'est donc pas surprenant que les méthodes de dosage microbiologiques deviennent inapplicables (limite de sensibilité dépassée) lors des anémies pernicieuses.

La méthode isotopique proposée par EKINS (2), dont la sensibilité est bien supérieure, peut être encore valablement utilisée dans ces cas pathologiques.

La méthode originale a, cependant, été modifiée et simplifiée. Ainsi, suivant les auteurs, le réactif spécifique est :

soit du plasma (43) ou un sérum (52) de sujet normal contenant la transcobalamine ;

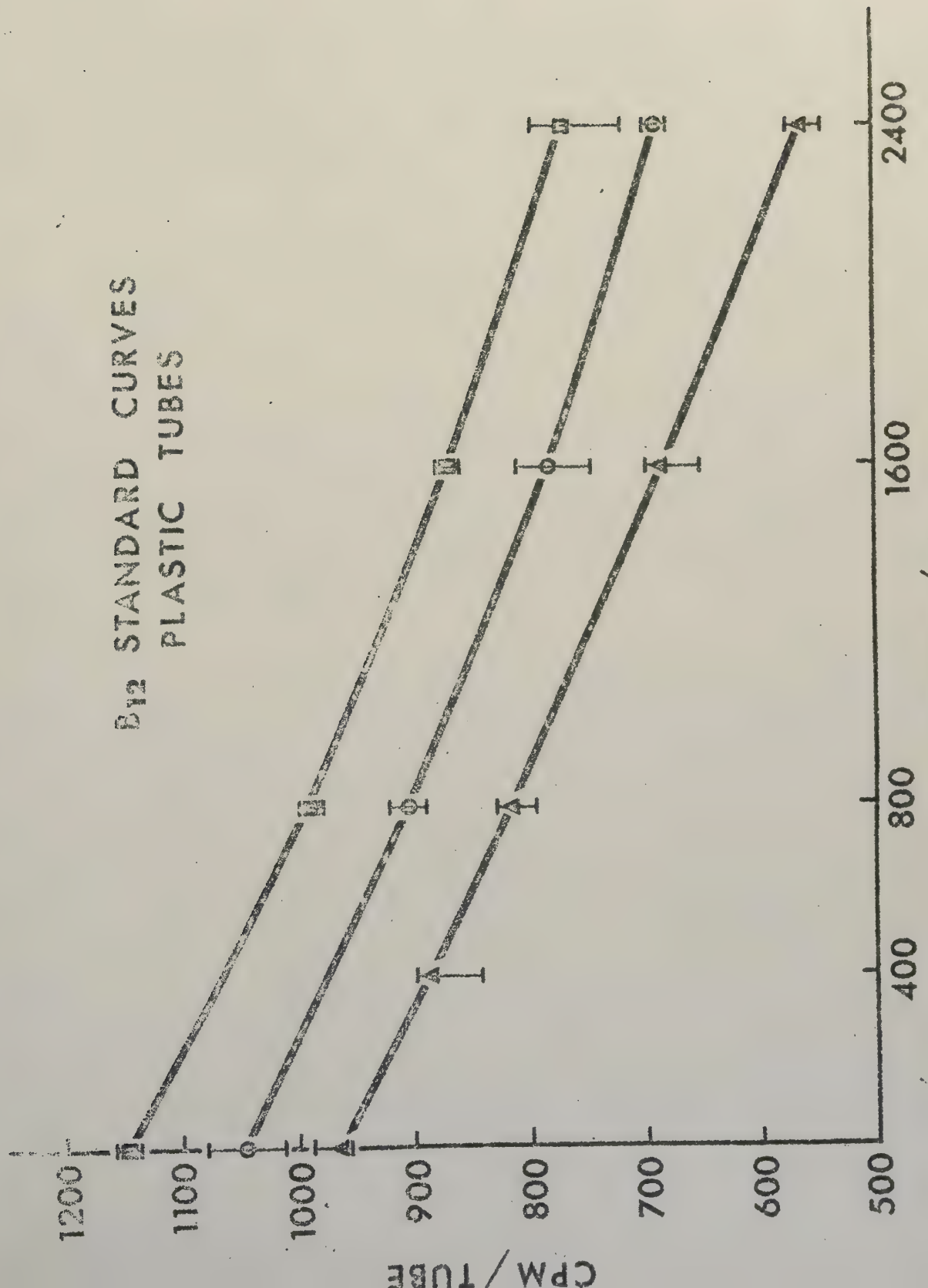
soit le facteur intrinsèque (72) ou du sérum de leucémique contenant de la transcobalamine I non saturée (129).

La technique de séparation utilise : la dialyse (2)(3), le charbon activé (42)(44), l'ultracentrifugation, la précipitation du complexe protéine-vitamine par du sulfate de zinc (129).

Une méthode originale proposée par ROOS (123) utilise la compétition, pour les sites de fixation d'une quantité déterminée de sérum provenant de sujets normaux, entre une quantité fixe de vitamine $B_{12}$-$^{57}Co$ (ajoutée à la solution de dosage) et la vitamine $B_{12}$ endogène. La fraction de vitamine $B_{12}$ liée à la protéine est fixée sur une résine Amberlite I R 120 CG Type II, présentée sous forme de capsules. La phase liquide, qui contient la fraction libre, est séparée de la résine par centrifugation. Il suffit alors de mesurer la radioactivité liée à la résine.

Pour simplifier encore cette séparation, RUBINI (131) préconise l'emploi de tubes préalablement enrobés de facteur intrinsèque R . Après la formation de RS , les tubes

Courbe n° 3


$B_{12}$ STANDARD CURVES
PLASTIC TUBES
CPM / TUBE
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
800
1600
2400
pg $B_{12}$ / ml

sont simplement vidés et rincés. La mesure de la radioactivité, retenue par le facteur intrinsèque, permet le calcul de la concentration de S dans la solution initiale. (cf courbe n°3, page 38).

Les tubes contenant le facteur intrinsèque sont préparés à l'avance et peuvent être conservés pendant 3 mois environ.

b) ANALYSE PAR DEPLACEMENT

Cette technique a pour but de mesurer le pourcentage du traceur radioactif déplacé des sites réactionnels de la protéine, par action de quantités déterminées croissantes du même composé non marqué.

Une courbe d'étalonnage décrivant cette évolution peut être tracée, et permettra de déduire la quantité inconnue de composé, extraite d'un échantillon, par la diminution du pourcentage de traceur lié qu'elle entraîne.

Il existe, à l'heure actuelle, de nombreuses applications de cette méthode utilisée principalement pour le dosage des hormones thyroïdiennes et stéroïdes.

- Dosage des hormones stéroïdes

D'une façon générale, les hormones stéroïdes étant faiblement antigéniques, les méthodes de dosage basées sur l'emploi des protéines de transport, ont été largement dé-

veloppés et ont permis les dosages suivants :

1 - Dosage de la testostérone (69)(74)(88)(90)(104)(119)(132), en utilisant la protéine liant spécifiquement la testostérone (P.L.T.) (92).

2 - Dosage des oestrogènes (84)(143), par l'emploi d'une protéine spécifique extraite de l'utérus et ayant une haute affinité pour le 17 β-oestradiol.

3 - Dosage des corticostéroïdestéroïdes (64)(99)(105)(106)(148), qui repose sur la possibilité d'isoler et de purifier la transcortine (C.B.G. ou corticosteroïd-binding-globulin) (20)(28)(29)(34)(100)(134)(141)(142)(144)(145).

4 - Dosage de la progestérone et de la 17 α-hydroxyprogestérone (113)(147)(165) qui se lient à la transcortine (141) et à l'orosomucoïde (155).

Nous allons étudier plus particulièrement le dosage du cortisol et de la progestérone.

Dosage du cortisol

Après extraction du cortisol par l'éthanol, MURPHY (103) met en contact le cortisol et la solution de transcortine (d'origine humaine) contenant de la corticostérone tritiée.

Dans un premier temps, le mélange réactionnel est mis

à incuber à 45°, puis est porté à la température de la glace fondante. La séparation de la fraction libre est réalisée à l'aide de florisil. On mesure alors la radioactivité de la fraction liée à la protéine.

NUGENT et MAYES (99) proposent une extraction par le dichlorométhane. Après incubation à la température ambiante, la séparation des deux fractions est faite par action d'un mélange de charbon actif et de dextran.

L'emploi de Terre de Fuller, au lieu de florisil comme adsorbant, permettrait une meilleure séparation du cortisol des autres stéroïdes (102). Ce procédé serait d'une grande utilité pour le dosage du cortisol urinaire.

Dosage du 11-désoxycortisol

Les mêmes méthodes sont applicables.

Le problème essentiel est l'isolement du 11-désoxy-cortisol du cortisol. Pour celà, deux techniques ont été proposées : la première utilise du tétrachlorure de carbone (64)(107) ; la seconde (148) emploie du dichlorométhane qui sera ultérieurement dissout dans du benzène.

Dosage de la progestérone

Plusieurs procédés ont été utilisés, mais le principe même du dosage est pour tous sensiblement identique, seule, la méthode d'extraction et de purification du stéroïde est notablement différente.

NEILL et coll. (113) proposent une extraction par l'éther de pétrole. La phase éthérée est alors soumise à une chromatographie sur couche mince, après évaporation. La transcortine employée pour ce dosage provient de plasma de Chien. La séparation du stéroïde libre est obtenue par adsorption sur florisil.

YOSHIMI et coll. (165) réalisent une extraction par l'éther éthylique, suivie d'une chromatographie ; l'éluat est ensuite purifié dans une petite colonne de silicate d'alumine. La protéine est obtenue à partir de plasma de femme ovariectomisée sous oestrogènes et déxaméthasone. La séparation des deux fractions se fait sur Séphadex selon la technique proposée par MURPHY (110).

- Dosage de la thyroxine

De nombreuses méthodes ont été proposées, mais nous retiendrons particulièrement celle présentée par le coffret diagnostic Tétrasorb-$^{125}$I (1) qui permet un dosage simple de la thyroxine totale sérique.

Cette technique associe à la fois la possibilité de lier au préalable la thyroxine-$^{125}$I à une solution de thyroxine-binding-globulin (T.B.G.) (KAPLAN (73)), et l'emploi d'une éponge résine qui sépare immédiatement les deux fractions (NAKAJIMA (112), KAPLAN (73) et KENNEDY (75))

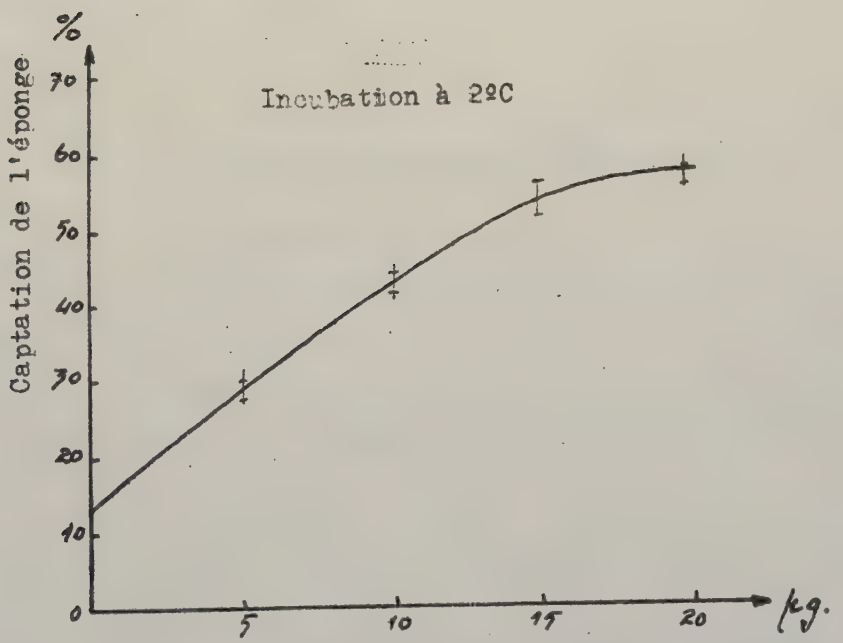
---

(1) Laboratoires ABBOTT, North Illinois CHICAGO, U.S.A.

En ajoutant des doses croissantes de thyroxine à la solution $T_4^*$ - T.B.G. , $T_4$ et $T_4^*$ entrent en compétition pour les sites de fixation de la T.B.G. A l'équilibre, la quantité de $T_4^*$ libérée de la T.B.G., sera d'autant plus grande que la concentration de $T_4$ non marquée ajoutée, est importante.

En rapportant le pourcentage de $T_4^*$ libérée en fonction des doses de $T_4$ ajoutée, on obtient la courbe d'étalonnage ci-dessous (cf Courbe n° 4).

Courbe n° 4



Dans l'échantillon à doser, la $T_4$, extraite avec l'éthanol, subit le même traitement que la $T_4$ des témoins.

La mesure de la radioactivité libérée permet de déduire la valeur de la thyroxine inconnue en se rapportant à la courbe d'étalonnage indiquée précédemment.

L'emploi d'une éponge-résine rend l'extraction simple et rapide après trois lavages, qui ne doivent pas dépasser 1 à 2 minutes, la fraction $T_4^*$ - T.B.G. est entièrement récupérée. Les résines soigneusement contrôlées forment des lots homogènes qui garantissent la fidélité de la méthode. Enfin, dernier avantage, il n'est pas nécessaire de procéder à des dilutions de solutions radioactives et les pipettages sont en nombre très restreint.

## 2° - DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

Ce procédé analytique développé par YALOW et BERSON (10)(161)(162), à partir du dosage de l'insuline en 1960 (5)(6)(7)(159), est l'application du même principe de base. il appelle, néanmoins, quelques précautions particulières liées à la réaction antigène-anticorps utilisée.

Les exigences nouvelles imposées par cette technique seront examinées avant l'exposé rapide des principales applications.

a) PRINCIPE

L'antigène de l'échantillon, non marqué, est en compétition avec l'antigène marqué pour la fixation sur l'anticorps. Il en résulte une diminution de la fixation de l'antigène marqé sur l'anticorps (12).

$$A.G. + A.C. + A.G.^{*} \rightleftharpoons A.G.\text{-}A.C. + A.G.^{*}\text{-}A.C.$$

On compare le degré d'inhibition compétitive dans l'échantillon et dans une solution étalon.

Pour augmenter la spécificité du dosage, il faut :

- Contrôler la non-interférence du milieu, et y remédier éventuellement en préparant les étalons dans du plasma dépourvu d'hormones (164) : la concentration du plasma en sel et protéines, le pH, la nature du tampon, ont une influence sur la réaction.

- S'assurer que la concentration hormonale endogène décroît proportionnellement avec le facteur de dilution. Cette vérification appelle une comparaison avec une courbe étalon (9) (159). La présence d'une substance donnant une réaction croisée est ainsi décelée.

Il est nécessaire de procéder à plusieurs déterminations, en utilisant chaque fois un antisérum différent, et de comparer les résultats obtenus (11)(161).

- Récupérer quantitativement l'hormone radioactive ajoutée au milieu réactionnel.

- Utiliser une hormone radioactive hautement purifiée et d'activité spécifique suffisante pour permettre le dosage des fractions ultérieurement séparées.

b) PRODUCTION ET SELECTION DES ANTISERUMS

α - Production

Nous avons vu que les méthodes précédentes utilisaient comme réactif une substance existant à l'état naturel.

Dans le cas particulier de la radioimmunologie, il est nécessaire d'injecter préalablement l'antigène (c'est-à-dire l'hormone), à l'animal, pour obtenir des anticorps.

YALOW et BERSON pensent qu'il n'est pas indispensable que l'antigène immunisant soit absolument pur. En effet, lors du dosage, aucune autre réaction immunologique ne peut interférer avec celle de l'hormone marquée, hautement purifiée, et de son anticorps spécifique (162).

La comparaison des résultats obtenus en utilisant les anticorps préparés à partir d'hormones purifiées et d'hormones naturelles, confirme qu'il n'est pas indispensable de procéder à une purification préalable de l'antigène (13) (35)(62)(162). En pratique, une hormone non purifiée est

préférée en raison de son prix de revient inférieur et de sa disponibilité plus grande.

Si l'hormone utilisée est un haptène, il est possible de lui conférer des propriétés antigéniques spécifiques en la couplant à de grosses molécules. Ainsi :

- LIEBERMAN et coll. en couplant certains stéroïdes à de l'albumine bovine obtiennent des anticorps anti-stéroïdes (4)(46)(47)(114).

- MIDGLEY et coll. (94) préparent des anticorps anti-oestrogènes en injectant une association albumine-oestrogène.

- CLUTTON et CHURCHILL (30)(31) obtiennent des anticorps vis-à-vis de la thyroxine par des dérivés "thyroxyl-protein".

- BROWN et EKINS (19) reprenant la méthode mise au point par HABER (66) pour la production des anticorps de l'angiotensine, couplent la méthyl-$T_3$ à la poly-L-lysine succinylée en présence d'un excès de carbodiimide.

Le composé obtenu présente des propriétés antigéniques spécifiques.

β - Sélection

Les animaux immunisés avec une même préparation hormonale et suivant le même schéma, donnent des anticorps

qui diffèrent non seulement dans leur concentration, mais aussi dans leur réaction avec l'antigène (162).

Si l'hormone à doser est à une forte concentration, comme dans le cas de l'insuline, de l'hormone de croissance et des gonadotrophines, la sensibilité de l'anti-sérum n'est pas critique.

Pour l'A.C.T.H., au contraire, dont la concentration (10 pg/ml) est faible, seuls, les anti-sérums fortement sensibles sont utilisables. Une sévère sélection est alors nécessaire.

Tous les anti-sérums à un antigène donné ne sont donc pas indifféremment valables : pour le dosage des hormones peptidiques humaines, par exemple, les anticorps du Cobaye donnent généralement des résultats supérieurs à ceux du Lapin.

c) APPLICATIONS

Du fait de sa spécificité, de sa sensibilité et de la possibilité de transformer un haptène en substance antigénique spécifique, le dosage radioimmunologique s'est considérablement développé ces dernières années.

Il est particulièrement appliqué aux dosages groupés dans le tableau suivant :

- HORMONES POLYPEPTIDIQUES ET DERIVEES DES PROTEINES

  • Hormones pancréatiques :

    insuline (56)(67)(68)(98)(154)(159)
    glucagon (47)(153)

  • Hormones ante-hypophysaires :

    hormone corticotrope (A.C.T.H.) (163)
    hormone thyréostimulante (T.S.H.) (115)
    hormone folliculostimulante (F.S.H.) (48)(93)(133)(135)(136)(137)(150)
    hormone stimulante des mélanophores (M.S.H.)
    hormone lutéinisante (L.H.) (133)(135)(136)(137)(138)(150)
    gonadotrophine chorionique (H.C.G.) (37)(151)
    hormone de croissance (H.G.H.) (27)(37)(58)(71)(124)

  • Hormones post-hypophysaires :

    ocytocine (57)
    vasopressine (125)

  • Hormones thyroïdiennes :

    thyrocalcitonine (35)
    thyroxine (30)
    triiodothyronine (19)

- HORMONES STEROIDES (1)(94)

- AUTRES HAPTENES (94)

Nous examinerons plus particulièrement :

- le dosage de l'insuline ;

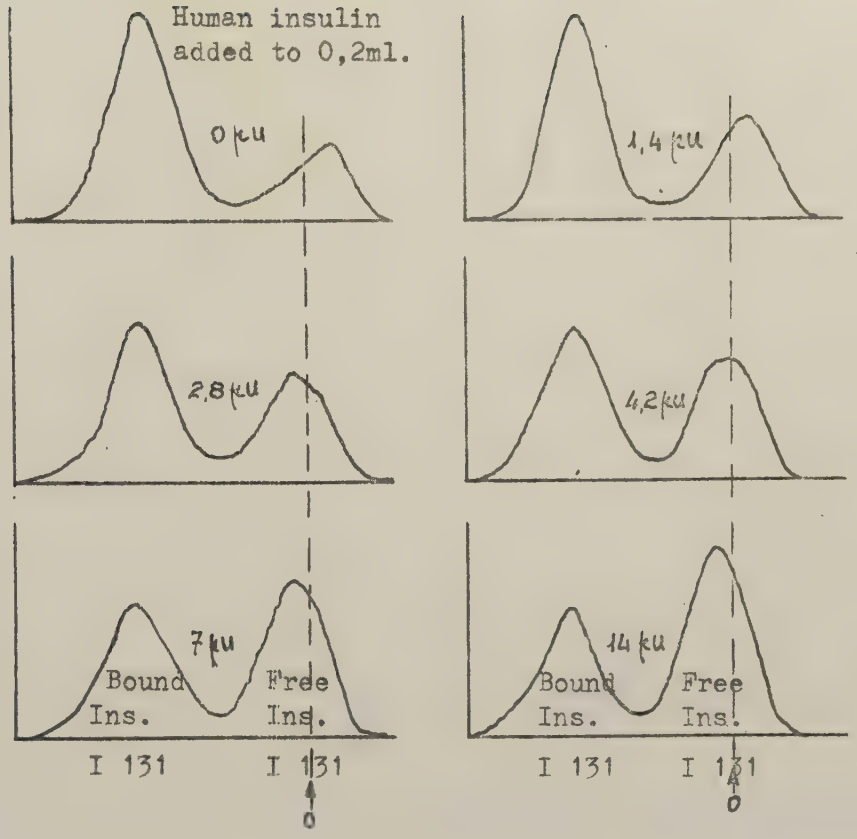
- le dosage de quelques hormones antehypophysaires ;

- le dosage de la triiodothyronine.

DOSAGE de l'INSULINE

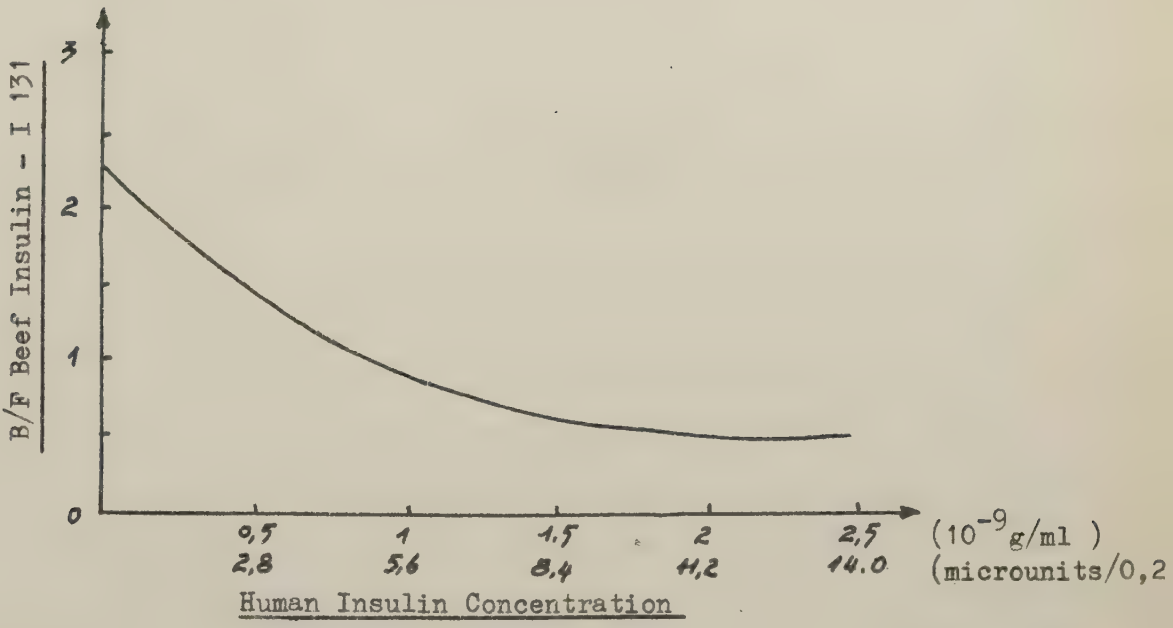
Comme nous l'avons vu, YALOW et BERSON (159) furent les premiers à mettre au point le dosage radioimmunologique de l'insuline.

Le réactif, c'est-à-dire, les anticorps, était obtenu à partir de sérum de Cobayes immunisés par de l'insuline bovine. L'hormone utilisée était marquée à $^{131}I$. Après incubation du milieu réactionnel, pour séparer l'hormone libre du complexe antigène-anticorps, ces auteurs ont mis à profit l'adsorption préférentielle de l'insuline sur la cellulose (5)(6)(7)(158)(159) : le mélange d'incubation déposé sur des bandes de papier, est soumis à une chromato-électrophorèse. L'hormone libre reste adsorbée à l'origine, tandis que le complexe hormone-anticorps migre avec les protéines sériques (12) (cf Courbe n° 5, d'après YALOW et BERSON (159)).




Courbe n° 5 d'après YALOW et BERSON (159)

Après calcul du rapport $\frac{B}{F}$ (où B représente la fraction liée et F la fraction libre), la courbe d'étalonnage suivante est obtenue. (cf Courbe n° 6 (159))




Courbe n° 6 d'après YALOW et BERSON (159)

Un certain nombre de modifications ont été apportées à cette méthode. Elles intéressent essentiellement les procédés de séparation. Ainsi, GRODSKY et FORSHAM (61) séparent les deux fractions par précipitation par le sulfate de sodium, tandis que WELBORN et coll. (154) procèdent à cette séparation à l'aide d'une réaction immunologique : Méthode du"double anticorps". Schématiquement, la technique proposée par ces auteurs comporte l'incubation du mélange réactionnel (insuline à doser + insuline $^{125}I$ + sérum anti-insuline de Cobaye) pendant 6 jours à 4° ; l'addition de sérum de Cobaye et des $\gamma$-globulines de Lapin anti-Cobaye est suivie d'une incubation de 24 h. Après cen-

trifugation, il suffit de décanter le surnageant et de mesurer la radioactivité du surnageant et du précipité pour obtenir le rapport $\frac{B}{F}$ .

DOSAGE de QUELQUES HORMONES ANTEHYPOPHYSAIRES

Il est possible d'obtenir, chez le Lapin, des antisérums dirigés contre :

- l'hormone folliculostimulante (F.S.H.)
- l'hormone lutéinisante hypophysaire (L.H.)
- et la gonadotrophine chorionique humaine (H.C.G.).

Ces anticorps ont permis à SAXENA (135) de proposer le dosage radioimmunologique de la F.S.H., L.H. et H.C.G. Cet auteur utilise $^{131}I$ pour le marquage de ces hormones. Après incubation du mélange réactionnel, les deux fractions sont séparées par chromato-électrophorèse.

Des modifications plus ou moins importantes ont été apportées aux techniques initialement proposées. CATT et TREGEAR (27) fixent le réactif sur la paroi interne de tubes plastiques. Le traceur H.C.G. est marqué par $^{125}I$ (22) suivant une modification de la méthode de GREENWOOD (60) et purifié sur colonne de cellulose (160). L'incubation à37°, du milieu réactionnel, est poursuivie pendant 1 à 2 jours. Une incubation de 24 heures, préalable à l'addition du traceur, augmente la sensibilité de la méthode.

DOSAGE de la TRIIODOTHYRONINE

Il a été déjà indiqué que le dosage de la triiodothyronine ($T_3$) par fixation compétitive sur la "thyroxin-globulin" (T.B.G.) était irréalisable en raison de l'affinité bien supérieure de la thyroxine ($T_4$) pour cette T.B.G. (36) et de la faible quantité de $T_3$ présente (250 ng/100ml) (118)(146).

Grâce à la possibilité de rendre antigénique la $T_3$, son dosage spécifique par radioimmunologie a pu être réalisé.

Rappelons que ce pouvoir antigénique résulte du couplage de la méthyl-$T_3$ avec la poly-L-lysine succinylée en présence d'un excès de carbodiimide (BROWN et EKINS (19)). Six semaines après l'injection à l'animal de ce composé, on administre la $T_3$ conjuguée à l'adjuvant de FREUND. Quinze jours après cette dernière injection, on obtient l'anti-sérum.

Le dosage proprement dit comporte :

- la fixation du traceur $T_3$-$^{125}I$ sur le sérum anti $T_3$ ;
- l'addition de l'échantillon contenant l'hormone à doser ;
- l'incubation de la solution pendant 21 heures ;
- la séparation des fractions radioactives par addition d'un mélange de charbon et de méthyl-cellulose qui

fixe la fraction libre, suivie de l'isolement de la fraction insoluble par centrifugation ;

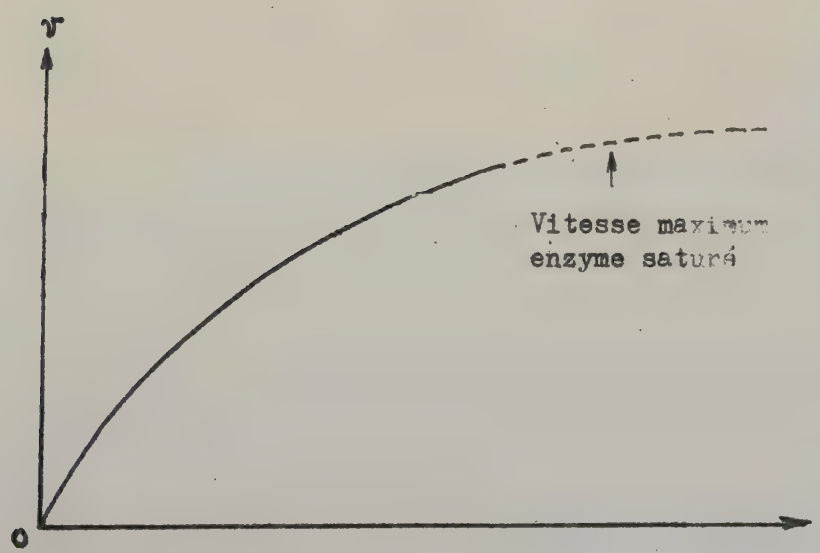
- le comptage de chaque fraction isolée.

En traitant ainsi des échantillons dont la concentration en $T_3$ est connue, on trace une courbe d'étalonnage en fonction du rapport $\frac{B}{F}$ .

Connaissant la valeur de $\frac{B}{F}$ pour une solution quelconque de $T_3$, on lit sur la courbe la valeur correspondante de la concentration de l'hormone.

## 3° - DOSAGE RADIOENZYMATIQUE

La théorie de MICHAELIS sur l'interaction enzyme-substrat (E-S) a montré que la vitesse de réaction augmentait proportionnellement avec la concentration du substrat, jusqu'à une vitesse maximum qui indique une saturation des sites réactionnels (cf Courbe n° 7 ci-dessous).



Si le milieu réactionnel contient un substrat marqué et qu'on ajoute un substrat non marqué, le pourcentage de $S^*$ transformé en $P^*$ croît, puis devient constant lorsque la vitesse de réaction est maximum.

Au voisinage de la vitesse maximum, si on continue à ajouter le substrat S non marqué, la probabilité de la réaction $E + S^*$ diminue et, en conséquence, il en résulte une diminution du pourcentage de $S^*$ transformé en $P^*$ :

$$S + S^* \xleftarrow{\text{Enzyme}} P + P^*$$

$$+ \text{ cofacteur} \qquad + \text{ cofacteur altéré}$$

où : S - représente le substrat

$S^*$ - " le substrat marqué

P - " le produit de transformation de S

$P^*$ - " le produit de transformation de $S^*$

Ici encore, pour un système enzymatique donné et pour $S^*$ constant, on construit une courbe d'étalonnage en fonction de $P^*$, connaissant la quantité de substrat ajouté au système et en mesurant la radioactivité correspondant à $P^*$.

En rapportant sur cette courbe étalon, l'inverse du pourcentage de $S^*$ converti en $P^*$ en présence d'un substrat inconnu, on obtient immédiatement sa concentration en S.

Avant d'appliquer ce principe général à différents systèmes enzymatiques, quelques observations doivent être

soulignées pour obtenir une bonne réalisation du dosage. Ainsi, il est nécessaire :

- de disposer de substrats marqué et non marqué, relativement purs ;
- de procéder à une extraction rigoureuse de l'enzyme et du cofacteur : la présence de substrat endogène, provenant du tissu d'extraction, diminue la sensibilité du dosage ;
- d'utiliser un traceur de haute activité spécifique pour permettre un dosage aux concentrations proches de celle du substrat à doser ;
- d'avoir un enzyme stable pour les faibles concentrations auxquelles il est employé ;
- et enfin, de disposer d'une méthode de séparation efficiente du substrat et du produit formé.

La principale application de cette méthode est le dosage de l'acide folique, développé par ROTHENBERG (127) (128)(129).

Dans ce cas, l'équation précédente devient :

$$\begin{array}{c} \text{Acide folique} \\ + \text{Acide folique-}{}^{3}\text{H} \\ + \text{NADPH} \end{array} \xrightarrow[\text{réductase}]{\text{Folate}} \begin{array}{c} \text{Acide tétrahydrofolique} \\ + \text{Acide tétrahydrofolique} \\ + \text{NADP} \end{array}$$

ROTHENBERG (130) utilise une folate réductase provenant de foie de Poulet et préparée selon la méthode de

ZAKRZEWSKI (167).

Après incubation du milieu réactionnel, l'acide folique et l'acide tétrahydrofolique formés sont séparés soit par chromatographie, soit par précipitation.

Comme nous l'avons vu précédemment dans le principe général, la quantité d'acide folique-$^{3}H$ transformé en acide tétrahydrofolique-$^{3}H$, est mesurée. L'inverse de cette valeur, reportée sur la courbe d'étalonnage, permet de déduire le taux d'acide folique présent dans l'échantillon.

Ce dosage, relativement simple, est d'une application pratique, en clinique, pour la mesure de la clearance de l'acide folique.

Remarquons enfin, que par cette méthode, en choisissant judicieusement les variables, il est possible de mesurer l'activité (130) :

- de l'enzyme ;
- d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme ;
- du cofacteur ;
- de l'enzyme secondaire qui catalyse la réaction de formation du cofacteur.

o

o

## CONCLUSION

Nous venons de passer en revue un certain nombre de méthodes basées sur l'emploi d'un "agent liant" spécifique.

Les applications multiples que nous avons citées, font ressortir l'importance de ces techniques qui permettent, non seulement le dosage de substances existant à l'état de traces, mais aussi celui de substances qui ne peuvent être dosées par aucune autre méthode.

A cette spécificité et à cette sensibilité s'ajoute une grande simplicité technique qui facilite leur utilisation comme dosage de routine.

# C O N C L U S I O N S  G E N E R A L E S

Au cours de cet exposé, nous avons dégagé les principes des différentes méthodes utilisant les indicateurs nucléaires "in vitro" et montré qu'elles relèvent de l'un des deux groupes suivants :

1°) L'analyse "dérivée"

Les techniques dérivées du principe proposé par KESTON en 1949 sont précises, mais l'isolement et la purification nécessaire des molécules à doser les rendent longues et onéreuses. Nous avons cité en exemple de leur complexité, le dosage des hormones stéroïdes qui implique un long processus d'isolement avant ou après l'estérification par l'anhydride acétique marqué.

2°) Les méthodes utilisant un "agent liant" spécifiq

Ce liant spécifique qui, théoriquement, peut avoi une origine quelconque, est généralement soit une protéine naturelle porteuse, soit une substance d'origine biologique

Comme exemple d'utilisation d'une protéine porteuse, nous avons retenu le dosage :

- de la thyroxine plasmatique où le liant spécifique est une globuline porteuse, la molécule de thyroxine étant marquée par $^{131}I$ ;

- de la vitamine $B_{12}$, dont la fraction radioactive porte en $^{57}Co$ et où le liant est la transcobalamine ;

- des stéroïdes, où le $^{3}H$ marque les molécules radioactives ajoutées et où le liant spécifique est la transcortine.

Un anticorps spécifique (substance d'origine biologique) joue le rôle de liant spécifique dans les techniques de dosage radioimmunologique où une fraction de l'hormone antigénique est marquée. Si jusqu'ici, seules, l'insuline et certaines hormones antéhypophysaires font l'objet de déterminations quantitatives courantes, cette méthode radioimmunologique paraît devoir connaître une large extension.

*
* *

D'une application relativement récente, les méthodes d'analyse quantitative utilisant les indicateurs "in vitro" sont déjà très couramment utilisées. Par leur très grande sensibilité, leur spécificité et leur reproductibilité, elles dépassent les techniques conventionnelles.

Particulièrement adaptées aux problèmes difficiles de la chimie hormonale, ne nécessitant pas l'administration préalable de substances radioactives, donc applicables sans restriction à l'Homme, ces méthodes d'analyse devront largement contribuer au développement de l'Endocrinologie.

# B I B L I O G R A P H I E


1 - ABRAHAM G.E. - Solid phase radioimmunoassay of estradiol 17 β - J. Clin. Endocr. Metab., 1969, 29, 866.

2 - BARAKAT M.R. , and EKINS R.P. - Assay of vitamin $B_{12}$ in blood a simple method. - Lancet 1961, 2, 25.

3 - BARAKAT M.R. and EKINS R.P. - An isotopic method for the determination of vitamin $B_{12}$ levels in blood. - Blood, 1963, 21, 70.

4 - BEISER S.M. and al. - Antigenicity of steroid-protein conjugates. - Science, 1959, 129, 564.

5 - BERSON S.A. - Resume of Conference on Insulin activity in blood and tissue fluids (LEVINE R., ANDERSON E.). - National Inst. of Health, Bethesda, Md, May 9-10, 1957 7.

6 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - Kinetics of reaction between insulin and insulin-binding antibody. - J. Clin. Invest. 1957,-36, 873

7 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - Isotopic tracers in the study of diabetes. - Adv. Biol. Med. Phys., 1958, 6, 349.

8 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - Iodoinsulin used to determine specific activity of iodine 131. - Science, 1966, 152, 205.

9 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - Principles of immunoassay of peptide hormones in plasma. - Clin. Endocrinol., 1967, 2, 699.

10 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - General principles of radio-immunoassay. - Clin. Chim. Acta, 1968, 22/1, 51.

11 - BERSON S.A. and YALOW R.S. - Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone. - J. Clin. Endocrinol., 1968, 28, 1037.

12 - BERSON S.A., YALOW R.S., LAUMAN A., ROTHSCHILD M.A. and NEWERLY K. - Insulin-$I^{131}$ metabolism in human subjects demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. - J. Clin. Invest., 1956, 35, 170.

13 - BERSON S.A., YALOW R.S., AURBACH G.D. and POTTS J.T. Jr - Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. - Proc. Natl. Acad. Sc., 1963, 49/5, 613.

14 - BOJESEN E., KESTON A. and CARSIOTIS M. - Reaction of stereoids with radioactive Pipsyl (p-iodophenylsulfonyl) Anhydride. - International Physiological Congress, 1953, XIV,220.

15 - BOJESEN E. and DEGN H. - A double isotope derivative method for the determination of Aldosterone in peripheral plasma. - Acta Endocr., 1961, 37, 541.

16 - BOJESEN E. - Concentrations of Aldosterone and corticosterone in peripheral plasma of Rats. The effects of salt depletion, salt repletion, potassium loading and intravenous injections of Renin and Angiotensin II. - Europ. J. Steroids, 1966, 1, 145.

17 - BOJESEN E., BUUS O., SVENDSEN R. and THUNEBERG L. - Isotope derivative methods for the determination of steroid hormones with $^{35}S$ sulfonylating reagents. - in "Qualitative and quantitative analyses of Steroid Hormones" (H. CARSTENSEN, Ed.) Marcel DEKKER, Inc. NEW-YORK, 1968.

18 - BRODIE A.H., SHIMIZU N., TAIT S.A.S. and TAIT J.R. - A method for the measurement of Aldosterone in peripheral plasma using $^{3}H$-acetic anhydride. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 997.

19 - BROWN B.L., EKINS R.P., ELLIS S.M. and REITH W.S. - A specific saturation assay technique for serum triiodothyronine. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research. - I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

20 - BUSH I.E. - The physicochemical state of cortisol in blood. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, 1957, Vol. 11 (Hormones in Blood), p. 263, CHURCHILL Ed. LONDON 1957.

21 - BUTT W.R. and LYNCH S.S. - Some observations on the radioimmunoassay of follicle stimulating hormone. - in Protein and polypeptide hormones, EXCERPTA MEDICA FOUNDATION I C S 161, MARGOULIES M. Ed., 1968, p. 134.

22 - CATT K.J. and CULROSS J. - A disposable radioiodination pipet. - Anal. Biochem., 1968, 26, 207.

23 - CATT K.J., NIALL H.D and TREGEAR G.W. - Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone. - Biochem . J., 1966, 100, 31 c.

24 - CATT K.J., NIALL H.D. and TREGEAR G.W. - A solid-phase disc radioimmunoassay for human growth hormone. - J. Lab. Clin. Med., 1967, 70, 820.

25 - CATT K.J. and TREGEAR G.W. - Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. - Science, 1967, 158, 1570.

26 - CATT K.J. and TREGEAR G.W. - Solid phase radioimmunoassay.- in Protein and polypeptides hormones, EXCERPTA MEDICA FOUNDATION, Part 1, MARGOULIES M. Ed., 1968, p. 45.

27 - CATT K.J., TREGEAR G.M. and BURGER H.G. - Radioimmunoassay of polypeptide hormones in antibody coated tubes. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

28 - CHADER G.J. and WESTPHAL U. - Steroid protein interactions. XVI : isolation and characterization of the corticosteroid binding globulin of the Rabbit. - J. Biol. Chem., 1968, 243, 928.

29 - CHADER G.J. and WESTPHAL U. - Steroid protein interactions. XVIII : isolation and observations on the polymeric nature of the corticosteroid binding globulin of the Rat. Biochem., 1968, 7, 4272.

30 - CHURCHILL W.H. and TAPLEY D.F. - Antibodies specific for Thyroxine and its analogues. - Nature, 1964, 202, 29.

31 - CLUTTOW R.F., HARINGTON C.R. and YUILL M.R. - Studies in immunochemistry. III : Preparation and antigenic properties of thyroxyl derivatives of proteins and physiological effects of their antisera. - Biochem. J., 1938, 32, 1119.

32 - COGHLAN J.P. and SCOGGINS B.A. - Measurement of Aldosterone in peripheral blood of Man and Sheep. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 1470.

33 - COGHLAN J.P., WINTOUR E.M. and SCOGGINS B.A. - The measurement of corticosteroids in Adrenal vein blood of Sheep. - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1966, 44, 639.

34 - DAUGHADAY W.H. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. III : The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. - J. Clin. Invest., 1958, 37, 511.

35 - DEFTOS L.J., LEE M.R. and POTTS J.T. Jr. - A radioimmunoassay for thyrocalcitonin. - Proc. Natl. Acad. Sc., 1968, 60, 293.

36 - DEISS W.P., ALBRIGHT E.C. and LARSON F.C. - Comparison of "in vitro" serum protein binding of Thyroxin and Triiodothyronine. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 84, 513.

37 - DONINI S., D'ALESSIO I. and DONINI P. - Radioimmunoassay of human chorionic gonadotrophin (HCG) and human luteinizing hormone (LH) using insoluble antibodies. - Gonadotropins (ROSENBERG E. Ed.), Geron-X, Los Altos, California, 1968.

38 - EKINS R.P. - The estimation of Thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. - Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 453.

39 - EKINS R.P. - Saturation analysis ; a microanalytical technique for assaying some compounds of biological importance. - in Radioaktive isotope in klinik und forschung, I and V, Vortrage am gasteiner Int. Symp. 1962, Urban und Schwarzenberg, MUNICH, 1963, 5, 211.

40 - EKINS R.P. - Theoretical aspects of saturation analysis. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA; 1969, in press.

41 - EKINS R.P., NEWMAN G.B. and O'RIORDAN J.L.H. - Saturation assays. - N.I.H. workshop Conference on statistics in Endocrinology, BOSTON, 1967, 19, in press.

42 - EKINS R.P., NEWMAN G.E. and O'RIORDAN J.L.H. - Theoretical aspects of "saturation" and radioimmunoassay. - in Radioisotopes in Medicine "in vitro" studies, R.L. HAYES, F.A. GOSWITZ and B.E.P. MURPHY Eds, U.S.A.E.C., OAK RIDGE Tenessee, 1968, p. 59.

43 - EKINS R.P. and SGHERZI A.M. - Radiochemical methods of analysis. - I.A.E.A., SALZBURG, 1964-1965, 2, 239.

44 - EKINS R.P. and SGHERZI A.M. - in Radioaktive isotope in klinik und forschung, 1965, 6, 466.

45 - EKINS R.P., WILLIAMS E.S. and ELLIS S. - The sensitive and precise measurement of serum Thyroxine by saturation analysis (competitive binding assay). - Clin. Biochem., 1969, 2, 253.

46 - ERLANGER B.F. and al. - Steroid-protein conjugates. I : Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. - J. Biol. Chem., 1957, 228, 713.

47 - ERLANGER B.F. and al. - Steroid-protein conjugates. II : Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, desoxycorticosterone and estrone. - J. Biol. Chem., 1959, 234, 1090.

48 - FAIMAN C. and RYAN R. - Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 444.

49 - FEINBERS R. - Detection of non precipitating antibodies coexisting with precipitating antibodies using $I^{131}$ labeled antigen. - Fed. Proc., 1954, 13, 493.

50 - FITSCHEN W. - A quantitative study of antigen-antibody combination during disk electrophoresis in acrylamide gel using iodine 131 labelled human growth hormone. - Immunology, 1964, 7, 307.

51 - FOSS O.P. - Quantitative determination of oxalate in urine by double isotope labelling technique. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

52 - FRENKEL E.P., KELLER S. and Mc CALL M.S. - Radioisotopic assay of serum Vitamin $B_{12}$ with the use of DEAE cellulose. J. Lab. Clin. Med., 1966, 68, 510.

53 - FRESCO J.R. and WARNER R.C. - Application of the isotope derivative method to the analysis of pyrimidines. - J. Biol. Chem., 1955, 215, 751.

54 - FRIEDNER S., JOSEPHSON B. and LEVIN K. - Vitamin $B_{12}$ determinations by means of radioisotope dilution and ultrafiltration. - Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 171.

55 - GANDY H.M. and PETERSON R.E. - Measurement of testosterone and 17-ketosteroids in plasma by the double isotope dilution derivative technique. - J. Clin. Endocr., 1968, 28,949.

56 - GENUTH S., FROHMAN L.A. and LEBOVITZ H.E. - A radioimmunological assay method for insulin using insulin-$^{125}$I and gel filtration. - J. Clin. Endocr., 1965, 25, 1043.

57 - GLICK S.M., KUMARESAN P., KAGAN A. and WHEELER M. - Radioimmunoassay of Oxytocin. - Proc. of the Int. Symp. on Protein and polypeptide hormones, LIEGE 1968, EXCERPTA MEDICA FOUNDATION, 1968, 1, 81.

58 - GLICK S.M., ROTH J., YALOW R.S. and BERSON S.A. - Immunoassay of human growth hormone in plasma. - Nature, 1963, 199, 784.

59 - GOODFRIEND T., BALL D. and UPDIKE S. - Antibody in polyacrylamide gel, a solid-phase reagent for radioimmunoassay. - Immunochemistry, 1969, 6, 481.

60 - GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. and GLOVER J.S. - The preparation of $^{131}$I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. - Biochem. J., 1963, 89, 114.

61 - GRODSKY G.M. and FORSHAM P.H. - An immunochemical assay of total extractable insulin in Man. - J. Clin. Invest., 1960, 39, 1070.

62 - Mc GUIGAN J.E. - Immunochemical studies with synthetic human gastrin. - Gastroenterology, 1968, 54, 1005.

63 - GUILLEMANT S., THOMOPOULOS P. et DESGREZ P. - Techniques de dosages par compétition de quelques hormones stéroïdes. - X° Reunion des endocrinologistes de Langue Française, MASSON, DOIN Eds, PARIS 1969, p. 139.

64 - GUILLEMANT S., THOMOPOULOS P. et DESGREZ P. - Test rapide à la métopirone au moyen de dosages plasmatiques. - Ann. Biol. Clin., sous presse.

65 - HABER E., PAGE L.B. et RICHARDS F.F. - Radioimmunoassay employing gel filtration. - Anal. Biochem., 1965, 12, 163

66 - HABER E., PAGE L.B. et JACOBY G.A. - Synthesis of antigenic branch chains of angiotensin and poly-L-Lysine. - Biochemistry, 1965, 4, 693.

67 - HALES C.N. and RANDLE P.J. - Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. - Biochem J. 1963, 88, 137.

68 - HERBERT V., LAU K.S., GOTTLIEB C.W. and BLEICHER S.J. - Coated charcoal immunoassay of insulin. - J. Clin. Endocr. Metab., 1965, 25, 1375.

69 - HEYNS W., VERHOEVEN G., VAN BAELEN H. and DE MOOR P. - Measurement of testosterone in plasma by competitive protein binding. - Ann. Endocr., 1969, 30, 153.

70 - HUDSON B., COGHLAN J.P., DULMANIS A., WINTOUR M. and EKKEL I. - The estimation of testosterone in biological fluids in testosterone in plasma. - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1963, 41, 235.

71 - HUNTER W.M. and GREENWOOD F.C. - A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. - Biochem. J., 1964 91, 43.

72 - JACOBS W.L.W. and ZONDAG H.A. - Radioisotopes assay of Vitamin $B_{12}$ in human blood serum. - Clin. Chim. Acta 1969, 24, 93.

73 - KAPLAN E.C. - A simple method for the determination of serum thyroxine. 133rd Meeting of American Association for the advancement of Science, Dec. 28, 1966.

74 - KATO T. and HORTON R. - A rapid method for the estimation of testosterone in female plasma. - Steroids, 1968, 12, 631.

75 - KENNEDY J.A. and ABELSON D.M. - Determination of serum thyroxine using a resin sponge technique. - J. Clin. Path., 1967, 20, 89.

76 - KESTON A.S. - General aspect of derivative analysis. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

77 - KESTON A.S. and LOSPALLUTO J. - Estimation of organic compounds as isotopic derivatives using the labelled organic compounds as indicators. - Amer. Soc. Biol.Chem. 1951, 10, 207.

78 - KESTON A.S. and LOSPALLUTO J. - Isotopic derivative method involving unfractionated mixtures of labelled compounds as indicators : amino acid estimation. - Fed. Proc., 1952, 11.

79 - KESTON A.S. and UDENFRIEND S. - The application of the isotopic derivative method to the analysis of proteins. Symposium on quantitative Biology, Cold Spring Harbor, 1950, XIV, 92.

80 - KESTON A.S., UDENFRIEND S. and CANNAN R.K. - Microanalysis of mixtures (amino acids) in the form of isotopic derivatives. - J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 1390.

81 - KESTON A.S., UDENFRIEND S. and CANNAN R.K. - A method for determination of organic compounds in the form of isotopic derivatives. I : Estimation of amino acids by the carrier technique. - J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 249.

82 - KESTON A.S., UDENFRIEND S. and LEVY M. - Paper chromatography applied to the isotopic derivative method of analysis. - J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 3151.

83 - KESTON A.S., UDENFRIEND S. and LEVY M. - Determination of organic compounds as isotopic derivatives. II : Amino - acids by paper chromatographic and indicator techniques. - J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 748.

84 - KORENMAN S.G. - Radioligand binding assay of specific estrogens, using a soluble uterine macromolecule. - J. Clin. Endocr., 1968, 28,1, 127.

85 - LAWRENCE A.M. - Radioimmunoassayable glucagon levels in Man : Effects of starvation hypoglycemia and glucose administration. - Proc. N.A.S., 1966, 55, 316.

86 - LEVY M. and SLOBODIANSKY E. - The application of the isotopic derivative technic to the study of protein structure. - Symposium on quantitative biology, 1950, X 113, Cold Spring Harbor, U.S.A.

87 - LIEBERMAN S., ERLANGER B.F., BEISER S.M. and AGATE E.J. - Steroid-protein conjugates : their chemical, immunochemical and endocrinological properties. - Recent progr. Hormone Res., 1959, 15, 165.

88 - MAEDA R., OKAMOTO M., WEGIENKA L.C. and FORSHAM P.H. - A clinically useful method for plasma testosterone determination. - Steroids, 1969, 13, 83.

89 - MATHIEU H.P. - Principe physico-chimique des méthodes isotopiques utilisant les propriétés des protéines porteuses plasmatiques pour un dosage indirect de la thyroxine. - Doctorat en Pharmacie (Etat) BORDEAUX 1967.

90 - MAYES D. and NUGENT C.A. - Determination of plasma testosterone by use of competitive protein binding. - J. Clin. Endocr., 1968, 28, 1169.

91 - MEADE R.C. and KLITGAARD H.M. - A simplified method for immunoassay of human serum insulin. - J. Nuclear Med. 1962, 3, 407.

92 - MERCIER C., ALEFSEN A. and BAULIEU E.E. - Androgens in normal and pathological conditions. - Proc. of Second Symposium on steroids hormones, EXCERPTA MEDICA FOUNDATION, International Congress, Series n° 101, E. EXLEY Ed., CHEUT, 1965, p. 212.

93 - MIDGLEY A.R. - Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 295.

94 - MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D. and RAM J.S. - Hapten-radioimmunoassay : a general procedure for the estimation of steroidal and other haptenic substances. Steroids, 1969, 13, 731.

95 - MILES L.E.M. and MALES C.N. - Labelled antibodies and immunological assay systems. - Nature, 1968, 219, 186.

96 - MITCHELL M.L. and BYRON J. - Use of enzyme proteolysis for the immunochemical measurement of insulin. - Diabetis, 1967, 16, 656.

97 - MOOR (P. de), HEIRWEIGH K., HEREMANS J.F. and DECLERCK-RASKIN M. - Protein binding of corticoids studied by gel filtration. - J. Clin. Invest., 1962, 41,4, 816.

98 - MORGAN C.R. and LAZAROW A. - Immunoassay of insulin : two antibody system. Plasma insulin levels of normal, sub-diabetic and diabetic rats. - Diabetis, 1963, 12, 115.

99 - NUGENT C.A. and MAYES D.M. - Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid binding globulin and dextran coated charcoal. - J. Clin. Endocr., 1966, 26, 1116.

100 - MULDOON T.G. and WESTPHAL U. - Steroid protein interactions. XIV : isolation and characterization of corticosteroid binding globulin from human plasma. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 5696.

101 - MURPHY B.E.P. - Application of the property of protein binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances. - Nature, 1964, 201, 673.

102 - MURPHY B.E.P. - Protein binding and its application in the assay of non antigenic hormones : thyroxine and steroids. - Radioisotopes in Medicine, Studies in vitro, A.E.C. Symp. Série 13.

103 - MURPHY B.E.P. - Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultra-micromeasurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 973.

104 - MURPHY B.E.P. - Binding of testosterone and oestradiol in plasma. - Canad. J. Biochem., 1968, 46, 299.

105 - MURPHY B.E.P. - Clinical evolution of urinary cortisol determination by competitive protein binding radio-assay. - J. Clin. Endocr., 1968, 28, 343.

106 - MURPHY B.E.P., ENGELBERG W. and PATTEE C.J. - Simple method for the determination of plasma corticoids. - J. Clin. Endocr., 1963, 23, 293.

107 - MURPHY B.E.P., HOOD A.B. and PATTEE C.J. - Clinical studies utilizing a new method for the serial determination of plasma corticoids. - Canad. Med. Ass. J., 1964, 90, 775.

108 - MURPHY B.E.P. and JACHAN C. - Determination of thyroxine by competitive protein-binding analysis employing an anion-exchange resin and radiothyroxine. - J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 161.

109 - MURPHY B.E.P. and PATTEE C.J. - Determination of thyroxine utilizing the property of protein-binding. - J. Clin. Endocr. Metab., 1964, 24, 187.

110 - MURPHY B.E.P. and PATTEE C.J. - Determination of plasma corticoids by competitive protein-binding analysis using gel filtration. - J. Clin. Endocr., 1964, 24, 919.

111 - MURPHY B.E.P., PATTEE C.J. and GOLD A. - Clinical evaluation of a new method for the determination of serum thyroxine. - J. Clin. Endocr. Metab., 1966, 26, 247.

112 - NAKAJIMA K., KURAMOCHI M., HORIGUCHI T. and KUBO S. - A new and simple method for the determination of thyroxine in serum. - J. Clin. Endocr. Metab., 1966, 26, 99.

113 - NEILL J.G., JOHANSSEN E.D.B., DATTA J.K. and KNOBIL E. - Relationship between the plasma levels of luteinizing hormone and progesterone during the normal menstrual cycle. - J. Clin. Endocr., 1967, 27, 1167.

114 - NERI R.O. and al. - Further studies on the biological effects of passive immunisation with antibodies to steroid-protein conjugates. - Endocrinology, 1964, 74, 593.

115 - ODELL W.D., WILBER J.F. and PAUL W.E. - Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. - J. Clin. Endocr., 1965, 25, 1179.

116 - ORSKOV H. - Wick-chromatography for the immunoassay of insulin. - Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, 20, 297.

117 - PETERSON R.E. - Determination of peripheral plasma aldosterone. - in "Aldosterone", (E.E. BAULIEU & P. ROBELS Eds), Blackwell Scientific Publications, OXFORD, 1964.

118 - PIND K. - Paper chromatographic determination of thyroid hormone (3,5,3'-triiodothyronine) in serum without radioiodine. - Acta Endocr., 1957, 26, 263.

119 - PIZARRO M.A. and ARREDONDO B. - Measurement of plasma testosterone by competitive protein binding. - Ann. Endocr., 1969, 30, 159.

120 - RIONDEL A., TAIT J.F., GUT M., TAIT S.A.S., JOACHIM E. and LITTLE B. - Estimation of testosterone in human peripheral blood using $S^{35}$-thiosemicarbazide - J. Cli . Endocr. Metab., 1963, 23, 620.

121 - RODBARD D., RAYFORD P.L., COOPER J.A. and ROSS G.T. - Statistical quality control of radioimmunoassays. - J. Clin. Endocr., 1968, 28, 1412.

122 - ROSSELIN G., ASSAN R., YALOW R.S. and BERSON S.A. - Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labeled with iodine 131 by talcum - powder and precipitated silica. - Nature, 1966, 212, 355.

123 - ROOS P. - A simple and rapid amberlite saturation analysis of serum vitamin $B_{12}$. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research. - I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

124 - ROTH J., GLICK S.M., YALOW R.S. and BERSON S.A. - Hypoglycemia : a potent stimulus to secretion of growth hormone. - Science, 1963, 140, 987.

125 - ROTH J., KLEIN L.A. and PETERSEN M.J. - Vasopressin antibodies and a sensitive radioimmunoassay. - J. Clin. Invest., 1966, 45, 1064.

126 - ROTHENBERG S.P. - A radioassay for folic acid reductase. Anal. Biochem., 1965, 13, 530.

127 - ROTHENBERG S.P. - A radioenzymatic assay for folic acid. Nature, 1965, 206, 1154.

128 - ROTHENBERG S.P. - A rapid radioassay for folic acid reductase and amethopterin. - Anal. Biochem., 1966, 16, 176.

129 - ROTHENBERG S.P. - in Blood, 1968, 31, 44.

130 - ROTHENBERG S.P. - Enzymatic reduction of $^{3}H$-folic acid a model application for radioenzymatic assay procedures. Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

131 - RUBINI J.R. - Simplified assay for vitamin $B_{12}$ in plastic tubes coated with intrisic factor. - Symposium "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

132 - RUDD B.T., ROSENFIELD R.L., BONGIOVANNI A.M. and EBERLEIN W.R. - The measurement of urinary testosterone glucuronide by competitive protein binding and validation by a double isotope derivative assay. - Steroids, 1969, 13, 227.

133 - RYAN R.S. and FAIMAN C. - Radioimmunoassay of F.S.H. and L.H. in human serum : the effects of age, and infusion of polyamines in males. - Gonadotropins, 1968 (ROSEMBERG E. Ed.), Geron[illegible] Los Altos, Calif., 1968, p.333.

134 - SANDBERG A.A., ROSENTHAL H., SCHNEIDER S.L. and SLAUNWHITE W.R.J. - Protein steroid interactions and their role in the transport and metabolism of steroids. - in Steroid Dynamics, PINCUS G., NAKAO T., TAIT J.F. Eds, Acad. Press 1966.

135 - SAXENA B.B. and GANDY H.M. - Use of radioisotopes for measurement of follicle stimulating (F.S.H.), luteinizing (L.H.) hormones, testosterone (T), androstenedione (A) dehydroepiandrosterone (D.H.E.A.), pregnenolone(P), cortisol and sulfates in plasma ; am levels and diurnal variation in man. - Symposium "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A. VIENNA, 1969, in press.

136 - SAXENA B.B., GANDY H.M. and PETERSON R.E. - Radioimmunoassay of F.S.H. and L.H. in body fluids. - Gonadotropins 1968 (ROSENBERG E. Ed.), Geron-X, Los Altos, Calif. 1968, p. 339.

137 - SAXENA B.B. - Radioimmunoassay of human follicle stimulating and luteinizing hormones in plasma. - J. Clin. Endocr., 1968, 25, 519.

138 - SCHALCH D.S. and al. - Measurement of human luteinizing hormones in plasma by radioimmunoassay. - J. Clin. Invest., 1968, 47, 665.

139 - SCHAYER R.W., KOBOYASHI Y. and SMILEY R.L. - Determination of histamine as an isotopic derivative. - J. Biol. Chem. 1955, 212, 593.

140 - SCOGGINS B.A., CAIN M.D., COGHLAN J.P., HUDSON B., ODDIE C.J., WINTOUR E.M. - The application of double isotope derivative dilution procedures to steroid hormone measurement. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

141 - SEAL U.S. and DOE R.P. - Corticosteroid binding globulin : biochemistry, physiology and phylogeny. - in Steroid Dynamics, (PINCUS G., NAKAO T., TAIT JF. EDs) Acad. Press, 1966.

142 - SEAL U.S. and DOE R.P. - Corticosteroid binding globulin distribution and small scale purification. - Endocrinology, 1963, 73, 371.

143 - SHUTT D.A. - Measurement of oestradiol-17-β in plasma by competitive protein binding radioassay. - Steroids, 1969, 13, 69.

144 - SLAUNWHITE W.R. Jr. and SANDBERG A.A. - Transcortin : a corticosteroid binding protein of plasma. - J. Clin. Invest., 1959, 38, 384.

145 - SLAUNWHITE W.R.Jr., SCHNEIDER S., WISSLER F.C. and SANDBERG A.A. - Transcortine : a corticosteroid binding protein of plasma. IX : isolation and characterization. - Biochemistry, 1966, 5, 3527.

146 - STERLING K., BELLABARBA D., NEWMAN E.S. and BRENNER M.A. - Determination of triiodothyronine concentration in human serum. - J. Clin. Invest., 1969, 48, 1150.

147 - STROTT C.A. and LIPSETT M.B. - Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human plasma. - J. Clin. Endocr., 1968, 28, 1426.

148 - STROTT C.A., WEST C.D., NAKAGAWA K, KONDO T. and TYLER F.H. Plasma 11-deoxycorticosteroid and A.C.T.H. response to metapyrone (plasma metapyrone test). - J. Clin. Endocr. 1969, 29, 6.

149 - SVENDSEN R. - A double isotopic derivative method for the quantitative determination of oestrone and 17- β - oestradiol in plasma. - Acta Endocr., 1960, 35, 161.

150 - TAYMOR M.L., TOSHIRO A. and PHETEPLALE C. - Serum levels of F.S.H. and L.H. by radioimmunoassay. - Gonadotropins, 1968, (ROSEMBERG E. Ed.), Geron-X, Los Altos, Calif., 1968, p. 347.

151 - THOMAS K. and FERIN J. - A new rapid radioimmunoassay for H.C.G. (L.H., I.C.S.H.) in plasma using dioxan. - J. Clin. Endocr., 1968, 28, 1667.

152 - UDENFRIEND S. and VELICK S.P. - The isotope derivative method of protein amino end group analysis. - J. Biol. Chem., 1951, 190, 733.

153 - UNGER R.H., EISENTRAUT A.M., Mc CALL M.S., KELLER S., LANZ H.C. and MADISON L.L. - Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. - Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 102, 621.

154 - WELBORN T.A., STENHOUSE N.S., CURNOW D.H. and JOHNSTONE C.G. The double antibody method for immunoassay of insulin : its application in population studies. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research., I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

155 - WESTPHAL M. and FORBES R. - Biological inactivation of progesterone by binding to alpha-1 acid glycoprotein (orosomucoïd). - Endocrinology, 1963, 73, 504.

156 - WHITEHEAD J.K. - Determination of amino-acids by double isotope - dilution technique. - Biochem. J. 1958, 68, 662.

157 - WIDE L. and PORATH J. - Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. - Biochem. Biophys. Acta, 1966, 130, 257.

158 - YALOW R.S. and BERSON S.A. - Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. - Nature, 1959, 184, 1648.

159 - YALOW R.S. and BERSON S.A. - Immunoassay of endogenous plasma insulin in Man. - J. Clin. Inv., 1960, 39, 1157.

160 - YALOW R.S. and BERSON S.A. - Preparation of high-specific activity iodine-131-labelled hormones : use in radio-immunoassay of hormones in plasma. - U.S.A.E.C., Symp. Ser. 1966, 6, 265.

161 - YALOW R.S. and BERSON S.A. - General principles of radio-immunoassay. - in "Radioisotopes in medicine "in vitro" studies (R.L. HAYES, F.S. GOSWITZ and B.E.P. MURPHY Eds) U.S.A.E.C., OAK RIDGE, Tennessee, 1968, p. 7.

162 - YALOW R.S. and BERSON S.A. - General aspects of radioimmu-noassay procedures. - Symposium on "in vitro" procedures with radioisotopes in clinical medicine and research, I.A.E.A., VIENNA, 1969, in press.

163 - YALOW R.S., GLICK S.M., ROTH J. and BERSON S.A. - Radioimmunoassay of human plasma A.C.T.H. - J. Clin. Endocr. Metab., 1964, 24, 1219.

164 - YALOW R.S., ROTH J. GLICK S.M. and BERSON S.A. - Radio-immunoassay of protein and peptide hormones in plasma. Proc. of the 2nd Int. Conf. of Endocr., LONDON 1964, EXCERPTA MEDICA FOUND., 1965, 1, 292.

165 - YOSHIMI T and LIPSETT M.B. - The measurement of plasma progesterone. - Steroids, 1968, 11-4, 527.

166 - ZAHARKO D.S. and BECK L.V. - Studies of a simplified plasma insulin immunoassay using cellulose powder. - Diabetis, 1968, 17, 444.

167 - ZAKRZEWSKI S.F. - Purification and properties of folic acid. - Nature, 1965, 206, 1154.